
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA**

**PARTICIPACIÓN DE ALX3 EN LA REGULACIÓN
DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE
INSULINA Y EN LOS MECANISMOS DE CONTROL
DE LA GLUCEMIA. IMPLICACIONES
PARA LA ETIOPATOGENIA DE LA DIABETES
MELLITUS**

Memoria que presenta la licenciada en Biología
Mercedes Mirasierra Cuevas para optar al grado de Doctor
Por la Universidad Autónoma de Madrid
Director de la tesis: Mario Vallejo Fdz de la Reguera

Madrid 2006

RESUMEN	4
SUMMARY	5
ABREVIATURAS	6
1.INTRODUCCIÓN	
1.1 Regulación de la secreción de insulina	7
1.2 Organogénesis pancreática	8
1.3 Diferenciación de las células que forman los islotes de Langerhans	11
1.4 Regulación de la expresión de insulina en células β	15
1.5 Fisiopatología de la diabetes mellitus	
1.5.1 Diabetes tipo I	19
1.5.2 Diabetes tipo II	20
1.5.3 Diabetes tipo MODY	21
1.5.3.1 Tipos de diabetes MODY	22
1.5.3.2 Mecanismos fisiopatológicos	25
1.6 Alx3	26
2.OBJETIVOS	27
3 MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Cultivos celulares	28
3.1.1 MIN6	28
3.1.2 RIN-1027-B2	28
3.1.3 RC2.E10	28
3.1.4 Otras líneas celulares	29
3.2 Plásmidos	29
3.2.1 Plásmidos que incorporan fragmentos del promotor de insulina	29
3.2.2 Vectores de expresión en células eucariotas	29

3.2.3 Vectores de expresión en células procariotas	31
3.3 Transfecciones	32
3.4 Western immunoblot	32
3.5 Inmunocitoquímica	33
3.6 Inmunohistoquímica	34
3.6.1 Inmunohistoquímica simple	34
3.6.2 Inmunohistoquímica de doble antígeno	34
3.7 Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en gel	35
3.8 Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina	36
3.9 Ensayos de interacción entre proteínas <i>in vitro</i>	39
3.10 Inmunoprecipitación	40
3.11 Evaluación de la función pancreática <i>in vivo</i>	40
3.11.1 Animales	40
3.11.2 Test de tolerancia a glucosa	41
3.11.3 Tratamiento con estreptozotocina	41
3.11.4 Determinación de la concentración de insulina en suero	42

4. RESULTADOS

4.1 Expresión de Alx3 en líneas celulares productoras de insulina y somatostatina	43
4.2 Expresión de Alx3 en los islotes pancreáticos	46
4.3 Alx3 presente en células β reconoce el elemento A3/4 del promotor de insulina	47
4.4 Alx3 induce la activación del promotor de insulina	49
4.5 Alx3 interacciona con E47/Pan1 pero no con Beta2	54
4.6 El homeodominio de Alx3 promueve la unión de E47/Pan1 al elemento E2A3/4	58
4.7 El homeodominio de Alx3 es suficiente para promover la transactivación dependiente de E47/Pan1	61
4.8 Participación de Alx3 en los mecanismos de control de la glucemia	64

4.9 La carencia de Alx3 aumenta la susceptibilidad al daño pancreático.....	67
--	-----------

5. DISCUSIÓN

5.1 Regulación de la transcripción del gen de insulina por Alx3 en células β pancreáticas.....	71
5.2 Alx3 regula la expresión de insulina mediante su interacción con E47/Pan1.....	72
5.3 Unión de Alx3 al elemento A3/4.....	75
5.4 Importancia funcional de Alx3 para el mantenimiento de la glucemia.....	76
5.5 Alx3 y diabetes tipo MODY.....	78

6 .CONCLUSIONES.....	80
-----------------------------	-----------

7. BIBLIOGRAFÍA.....	81
-----------------------------	-----------

RESUMEN

La regulación de la expresión del gen de insulina en células β pancreáticas es el resultado de la actividad coordinada de un número determinado de factores de transcripción ensamblados sobre diferentes elementos del promotor. En esta tesis se estudia el papel que la proteína tipo homeodominio Alx3 de la familia *aristaless* desempeña en este proceso. Con el fin de determinar si Alx3 es importante para la función de los islotes pancreáticos, nos planteamos los siguientes objetivos: 1) Determinar la expresión de Alx3 durante el desarrollo embrionario y en el adulto; 2) Evaluar la participación de Alx3 en la regulación de la expresión del gen de insulina; y 3) Determinar la participación de Alx3 en los mecanismos de regulación de la glucemia.

Los resultados de esta tesis demuestran que Alx3 se coexpresa con insulina en islotes pancreáticos, así como en la línea celular derivada de insulinoma MIN6. Además, Alx3 está presente en células que expresan glucagón y somatostatina. Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina indican que en células MIN6 y en islotes pancreáticos de ratón Alx3 ocupa el promotor del gen de insulina. Por otra parte los ensayos de retardo de banda realizados con extractos de células MIN6 muestran que Alx3 se une al elemento regulador A3/4 del promotor de insulina I. Este trabajo demuestra que Alx3 transactiva el promotor de insulina, actuando sobre el elemento E2A3/4, en cooperación con los factores de transcripción tipo bHLH E47/Pan1 y Beta2. En concreto, Alx3 interacciona físicamente a través de su homeodominio con E47/Pan1 pero no con Beta2. Alx3 se une al elemento A3/4 como dímero y recluta a E47/Pan1 al promotor de insulina a través de su homeodominio. Los estudios de transfección realizados en células Hela muestran que las tres regiones ricas en prolina que forman parte de Alx3 contribuyen a su activación transcripcional. A su vez, E47/Pan1, unido a Alx3 a través de su homeodominio, contribuye a la activación transcripcional por medio de sus dominios de activación específicos.

Por último los estudios realizados con animales genéticamente modificados demuestran que la integridad de Alx3 es necesaria para el correcto funcionamiento de los mecanismos que controlan la glucemia, incluyendo el mantenimiento de concentraciones adecuadas de insulina en sangre. Por tanto, es posible que Alx3 constituya un candidato a tener en cuenta en el estudio de la etiopatogénesis de ciertos tipos de diabetes mellitus.

SUMMARY

The regulation of insulin gene expression in pancreatic β -cells is the result of the coordinate activity of specific combinations of transcription factors assembled on different promoter elements. We investigated the involvement of the *aristaless*-related homeoprotein Alx3 in this process. In order to determine whether Alx3 is important for pancreatic islet function, we considered the following objectives: 1) To examine the expression of Alx3 in pancreatic islets during embryonic development and in the adult; 2) To evaluate the role of Alx3 in the regulation of insulin gene expression; and 3) To determinate the involvement of Alx3 in the mechanisms that regulate the blood glucose levels. We found that Alx3 is coexpressed with insulin in pancreatic islets, as well as in the β -cell line MIN6, and it is also present in glucagon- and somatostatin-expressing cells. Chromatin immunoprecipitation assays indicated that Alx3 present in MIN6 cells and in mouse pancreatic islets occupies the promoter of the mouse insulin genes. Electrophoretic mobility shift assays indicated that Alx3 present in MIN6 cells binds to the A3/4 regulatory element of the insulin I promoter. We found that Alx3 transactivates the insulin promoter by acting on the E2A3/4 enhancer in conjunction with the basic-helix-loop-helix transcription factors E47/Pan1 and Beta2, and that Alx3 physically interacts via the homeodomain with E47/Pan1 but not with Beta2. Alx3 binds to the A3/4 element as a dimmer, and the homeodomain is sufficient to recruit E47/Pan1 to the insulin promoter. Transfection studies carried out in hela cells show that the three proline-rich regions of Alx3 contribute to transcriptional transactivation. In turn, E47/Pan1 bound to the Alx3 homeodomain, contributes via specific transactivation domains to the overall activity.

Studies carried out with genetically engineered animals showed that Alx3 integrity is required for adequate function of mechanisms that regulate blood glucose levels, including maintenance of proper concentration of serum insulin. Thus, it is possible to propose Alx3 as a possible candidate in the etiopathogenesis of diabetes mellitus.

ABREVIATURAS

bHLH: *basic helix-loop-helix*. Dominio básico hélice-lazo-hélice.

BMP: *Bone morphogenetic protein*. Proteína morfogenética de hueso.

CAT: *Choramphenicol acetyltransferase*. Cloranfenicol acetiltransferasa

ChIP: *Chromatin immunoprecipitation*. Inmunoprecipitación de cromatina

CBP: *CREB binding protein*. Proteína de unión a CREB

CRE: *cAMP response element*. Elemento de respuesta a AMPc

CREB: *cAMP response element binding protein*. Proteína de union al elemento de respuesta a AMPc.

CREM: *cAMP response element modulator*. Modulador de CRE

EMSA: *Electrophoretic mobility shift assay*. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética en gel.

FGF: *Fibroblast growth factor*. Factor de crecimiento de fibroblastos

GLUT: *Glucose transporter*. Transportador de glucosa.

GST: *glutathione S-transferase*. Glutation S-transferasa

HMG: *High mobility group*. Grupo de alta movilidad

HNF: *Hepatic Nuclear Factor*. Factor hepático nuclear.

MODY: *Maturity onset diabetes of the young*. Diabetes tipo MODY.

INTRODUCCIÓN

1.1 Regulación de la secreción de insulina

El páncreas es una glándula de secreción mixta en la que se distinguen dos compartimentos distintos, uno endocrino y otro exocrino. La porción exocrina está compuesta por acinos, cuyas células producen enzimas digestivas, tales como lipasas, proteasas y nucleasas, y estructuras ductales epiteliales ampliamente ramificadas que conducen las enzimas digestivas al intestino, donde contribuyen a la digestión del alimento.

La porción endocrina, que sólo comprende del 1 al 5% de la masa glandular está compuesta por los islotes de Langerhans, agregados de células derivadas del endodermo que se distribuyen en todo el volumen de la glándula. Los islotes contienen cuatro tipos celulares definidos por las hormonas que secretan: células β productoras de insulina, células α productoras de glucagón, células δ productoras de somatostatina y células PP productoras de polipéptido pancreático. Entre el 60 y el 80% de las células endocrinas son células β , del 15 al 20% son células α , entre el 5 y el 10% son células δ y menos de un 2% son células productoras de polipéptido pancreático.

La insulina fue aislada por primera vez en el año 1922 por el cirujano canadiense Frederick Banting y su ayudante Charles Best (Banting et al., 1991) a partir de páncreas de perro, y purificada más tarde por el bioquímico James Collip. Banting y su supervisor, James Macleod recibieron el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 1923.

Las células β pancreáticas sintetizan insulina y la secretan de modo que se mantengan los niveles de glucosa en sangre dentro de un estrecho rango. En humanos los niveles de normoglucemia se sitúan entre 70-105 mg/dl, y en el ratón se sitúa entre 100-150 mg/dl. Una vez liberada, la insulina sirve de señal a los tejidos diana (hígado, músculo y tejido adiposo) para captar glucosa. Las alteraciones en el proceso de secreción de insulina tienen un profundo impacto sobre la homeostasis de la glucosa: una excesiva secreción causa hipoglucemia y una secreción insuficiente da lugar a diabetes. Este aparentemente simple papel de las células β contrasta con la complejidad de su regulación, la cual viene determinada por una serie de factores metabólicos (glucosa y otros nutrientes), neurales, hormonales y a veces farmacológicos.

El estudio del acoplamiento entre estímulo y secreción en células β comenzó en los años sesenta y rápidamente dió lugar a tres descubrimientos fundamentales. Primero,

la glucosa puede ser metabolizada por las células β para inducir la secreción de insulina. Esta conclusión se basó en que el efecto insulínico de la glucosa es inhibido por agentes que interfieren con el metabolismo celular y es mimetizado solamente por azúcares metabolizados (Grodsky and Bennett, 1963; Goore and Thompson, 1967). Segundo, el calcio tiene un papel esencial en la secreción de insulina. Esto está bien establecido por la demostración de que la glucosa no incrementa la secreción de insulina en ausencia de Ca^{2+} extracelular (Grodsky and Bennett, 1966; Milner and Hales, 1967). Tercero, las células β pancreáticas son eléctricamente excitables. Esto fue demostrado mediante la obtención de potenciales de acción en células β estimuladas por glucosa (Dean and Matthews, 1968).

La capacidad que poseen las células β de adaptar la secreción de insulina a las fluctuaciones de glucosa en sangre depende de la expresión de un transportador de glucosa de baja afinidad llamado GLUT2, así como de la fosforilación de la glucosa en el interior de la célula por parte de una hexoquinasa IV llamada glucocinasa. Esta enzima constituye un verdadero “sensor de glucosa” (German, 1993) y ahora se sabe que mutaciones en el gen de la glucocinasa dan lugar a la aparición de diabetes debido a una secreción incorrecta de insulina. Una vez fosforilada, la glucosa es susceptible de ser sometida a glucólisis generando piruvato que entra en la mitocondria. Este actúa como sustrato del ciclo de Krebs provocando un incremento en la producción de ATP citosólico, lo que a su vez produce el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP. El cierre de estos canales despolariza la membrana plasmática provocando la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, con la consiguiente entrada de Ca^{2+} a la célula a través de un gradiente electroquímico. De este modo se estimula la fusión de vesículas secretoras que contienen insulina liberándola de modo pulsátil (Holz and Habener, 1992) (Figura 1).

Los principales tejidos diana de la insulina son el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el tejido adiposo y el hígado. La insulina estimula el transporte de glucosa hacia el músculo y tejido adiposo provocando la disminución de los niveles de glucosa en sangre, incrementando el almacenamiento de carbohidratos e inhibiendo la lipólisis. En el hígado la insulina tiene como efecto la inhibición de la gluconeogénesis.

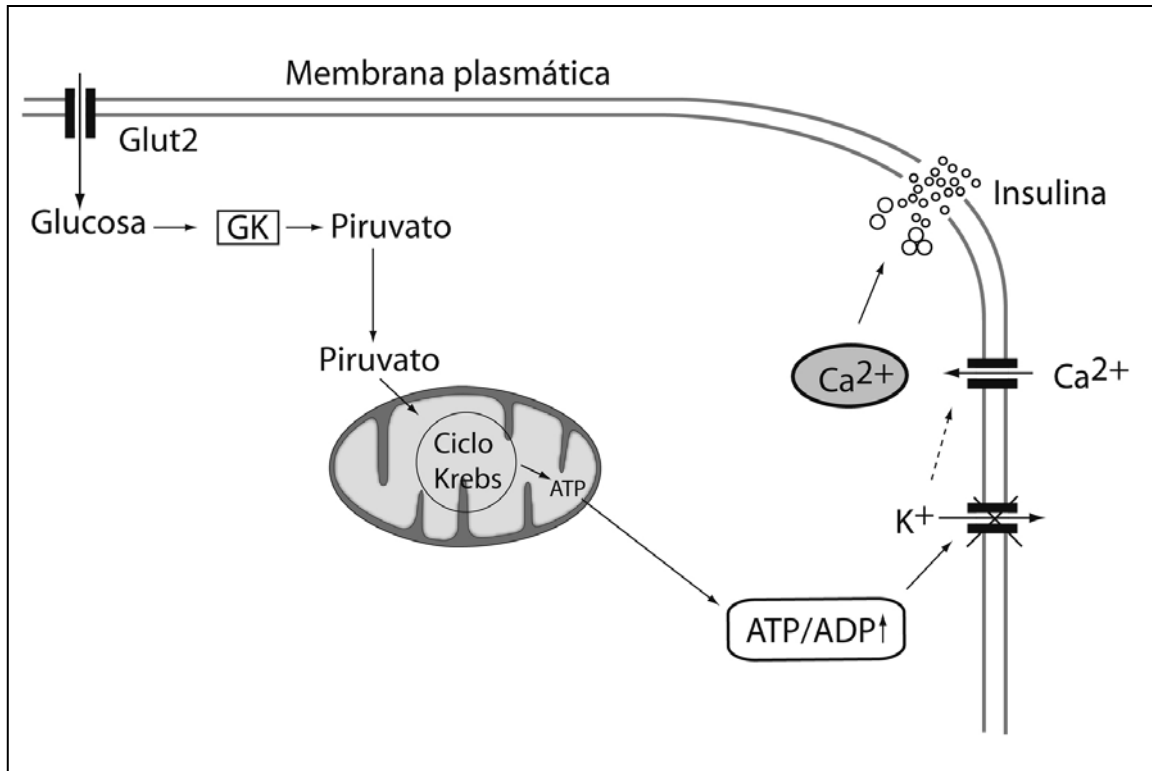


Figura 1: Acoplamiento del metabolismo de la glucosa a la secreción de insulina en la célula β . GK, glucocinasa.

1.1 Organogénesis pancreática

El desarrollo embrionario pancreático se ha estudiado especialmente en ratón. El páncreas se forma a partir de dos primordios, uno dorsal y otro ventral, del epitelio primitivo del estómago. Estos dos bulbos crecen, se arquean, y se fusionan para formar el páncreas definitivo (Figura 2).

Antes de que se establezca la especificación del primordio pancreático, la línea media del endodermo en el intestino anterior está constituido por una capa de células epiteliales que contactan con la notocorda, una estructura derivada del mesodermo axial. El bulbo ventral se forma a partir de células que escapan del efecto inhibitorio del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) (Deutsch et al., 2001) y responden a la señalización de la proteína morfogenética de hueso (BMP4) (Weaver et al., 1999; Rossi et al., 2001). Estas señales provienen del septo transversal del mesodermo. En contraste, la notocorda promueve el desarrollo pancreático dorsal a través de un proceso que

implica la represión de la expresión de Sonic hedgehog en el mesodermo axial (Hebrok et al., 1998; Edlund, 2001).

En ratones el comienzo de la diferenciación celular endocrina ocurre en el día 8.5 postcoito. En este momento ya es detectable el ARN mensajero de la somatostatina (Herrera et al., 1991; Gittes and Rutter, 1992). La primera señal de morfogénesis ocurre en el día 9.5, que corresponde a un estadio de 22-25 somitas, cuando el mesénquima dorsal se condensa y el endodermo se evagina formando un bulbo dorsal pancreático reconocible. El bulbo ventral aparece más tarde, en el estadio de 30 somitas (10.25-10.5 días postcoito). Estimuladas por señales mesenquimales, las células epiteliales pancreáticas proliferan y se ramifican.

La diferenciación de las células endocrinas, acinares y ductales no tiene lugar hasta el día 14.5; en este momento las células endocrinas se encuentran como células individuales presentes en estructuras ductales o en pequeños grupos distintos de los ductos. La arquitectura celular típica de los islotes, en los que las células β se sitúan en el centro del mismo rodeadas del resto de las células, aparece de forma tardía en el desarrollo embrionario (día 18 postcoito).

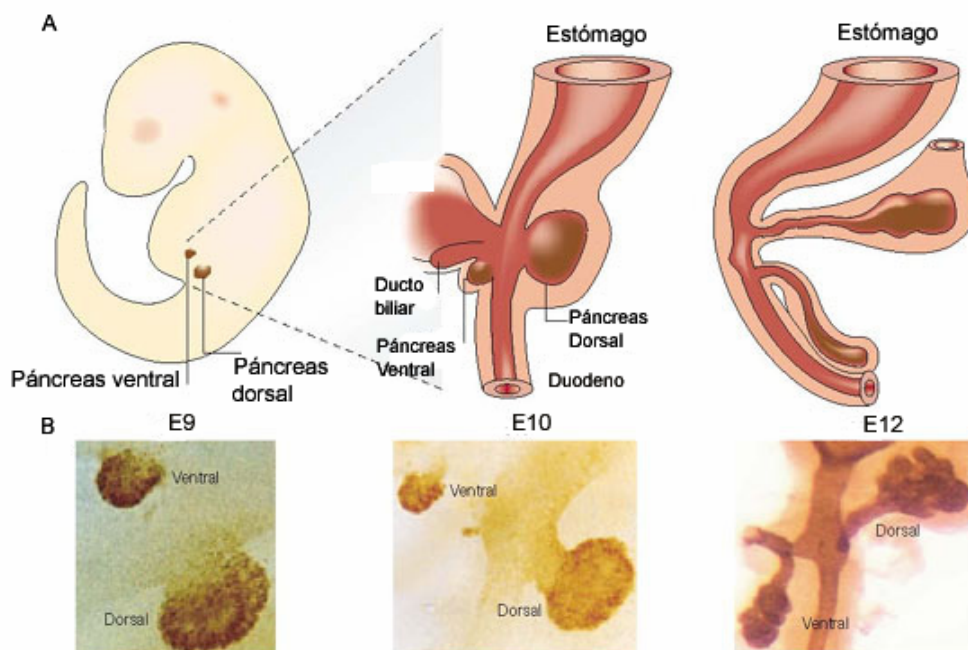


Figura 2: A) Representación esquemática del desarrollo embrionario pancreático de ratón. B) Fotografías de los correspondientes estadios usando análisis inmunohistoquímico con un antisuero anti-Pdx1 para marcar el páncreas en desarrollo. E9, E10 y E12 denotan la edad embrionaria en días de gestación.

1.3 Diferenciación de las células que forman los islotes de Langerhans

En la actualidad es conocido que todas las células pancreáticas provienen de un único grupo de células pluripotenciales que generan tres tipos celulares: células endocrinas, células acinares y células ductales. Para que tenga lugar este proceso es indispensable la acción de diferentes factores de transcripción que se expresan jerárquicamente (Figura 3). Así, la expresión del factor de tipo homeodominio Pdx1, restringida específicamente a este grupo de células, es necesaria para la formación y progresión de los dos bulbos que constituyen el primordio del páncreas (Jonson et al., 1994; Kawaguchi et al., 2002). De hecho, la carencia de Pdx1 da lugar a agénesis pancreática (Stoffers et al., 1997b). La especificación y diferenciación del bulbo dorsal requiere la expresión de Hb9 e Isl1 (Li et al., 1999) (Ahlgren et al., 1997), mientras que el ventral requiere Hex1 (Bort et al., 2004).

Entre los días embrionarios 14 y 17 el epitelio prediferenciado forma una estructura ductal bien definida que se caracteriza por la expresión de HNF1 β (Maestro et al., 2003), HNF6 (Jacquemin et al., 2000), y FoxA (Lee et al., 2001). A partir de ese momento la expresión secuencial y jerárquica de otros factores de transcripción en virtud de programas genéticamente regulados determinará la diferenciación de los diferentes tipos de células pancreáticas.

En parte, la puesta en marcha de cada uno de estos programas de diferenciación celular está regulada mediante la acción de señales extracelulares entre las que destaca la vía de señalización por Notch. Los receptores Notch están involucrados en la regulación del balance entre la diferenciación celular y la proliferación de células pluripotenciales durante el desarrollo de numerosos tejidos (Artavanis-Tsakonas et al., 1995). La interacción de Notch con su ligando, Delta, tiene como consecuencia la activación de Hes1, un represor transcripcional de la familia bHLH (*basic helix-loop-helix*), que actúa como inhibidor de la especificación de las células endocrinas. Las células en las que se active Hes1 formarán por tanto, parte del páncreas exocrino. Este hecho junto a la expresión del factor de transcripción tipo bHLH p48, es determinante para dirigir la diferenciación pancreática hacia un linaje exocrino (Krapp et al., 1996; Krapp et al., 1998; Obata et al., 2001).

En las células que expresan HNF1 β no se activa Notch, y esto induce la expresión el factor de transcripción bHLH neurogenina 3 (Ngn3). Ngn3 dirige a las

células indiferenciadas hacia un fenotipo de célula endocrina e inicia el programa de diferenciación del islote (Gradwohl et al., 2000; Gu et al., 2002). Así, se ha observado que los ratones carentes de Ngn3 no expresan factores de transcripción característicos de un fenotipo endocrino, como Beta2, Pax4, Nkx2.2 y Pax6 (Gradwohl et al., 2000), mientras que por el contrario, la expresión ectópica de Ngn3 conduce al endodermo embrionario hacia una determinación endocrina (Grapin-Botton et al., 2001). Estudios llevados a cabo en células ductales humanas, en las que se expresó artificialmente Ngn3, muestran cómo se induce la expresión de los factores de transcripción IA1, Beta2, Pax4, Nkx2.2 y Pax6 (Heremans et al., 2002), reguladores transcripcionales que se encuentran bajo el control directo de Ngn3 y contribuyen a la diferenciación de las células β .

IA1 es un factor de transcripción que posee un dominio de dedos de zinc y es una diana directa de Ngn3. Durante el desarrollo pancreático IA1 y Ngn3 presentan un patrón de expresión espacio temporal prácticamente idéntico. Sin embargo, los embriones carentes de Ngn3 no expresan IA1, lo que muestra que aunque cercana en el tiempo la expresión de Ngn3 ha de ser anterior a la de IA1. Por el contrario, la expresión de IA1 es completamente normal en embriones carentes de Beta2, Pax4 y Pax6, lo que significa que se expresa antes que estas otras dianas de neurogenina3 (Mellitzer et al., 2006).

A diferencia de Ngn3, que no se expresa en células endocrinas diferenciadas, Beta2, un factor de transcripción que pertenece a la familia bHLH, permanece estable en las células del islote donde regula la supervivencia y diferenciación terminal de las células β (Naya et al., 1997).

La Ngn3 también regula directamente la expresión de Pax4 (Gradwohl et al., 2000). Pax4 comienza a expresarse en el día embrionario 9.5 y en el momento del nacimiento su expresión se restringe a las células β . Los ratones carentes de Pax4 presentan una ausencia total de células β y δ , y un aumento de las células α (Sosa-Pineda et al., 1997). Es decir, funciona de forma temprana en el desarrollo y promueve la diferenciación de células β y δ .

Los miembros de la familia Nkx2, Nkx2.2 y Nkx6.1 son importantes reguladores de la diferenciación de células β . Nkx2.2 se expresa a bajo nivel en células epiteliales prediferenciadas, y más tarde presenta un pico de inducción en las células que expresan Ngn3 y mantiene su expresión en células endocrinas ya diferenciadas (Watada et al., 2003). Trabajos realizados con animales carentes del gen Nkx2.2 muestran una carencia de células β productoras de insulina (Sussel et al., 1998). Nkx6.1 es diana directa de

Nkx2.2 y se expresa en células β maduras. Los animales carentes del gen Nkx6.1 presentan una reducción selectiva de células β sin verse afectado el resto de tipos celulares endocrinos (Sander et al., 2000).

En cuanto a la diferenciación de las células α , un factor fundamental es Arx, de la familia de los homedominios tipo *aristaleless*, cuya expresión es suprimida en células no- α por Pax4. Arx y Pax4 tienen acciones opuestas en el desarrollo del páncreas endocrino. Así, los ratones carentes de Arx (Collombat et al., 2003) presentan un fenotipo opuesto al de los animales carentes de Pax4, pudiéndose observar un incremento en el número de células β y δ y una ausencia de células α . Por tanto parece ser que Arx promueve el destino de las células α antagonizando el de las β y δ .

En las células α ya diferenciadas se encuentra Brn4, de la familia POU, que regula la expresión de glucagón (Hussain et al., 1997). Experimentos realizados con ratones carentes del gen brn4 (Phippard et al., 1999) no presentan ningún defecto en la formación de las células α , lo que demuestra que brn4 interviene en estadios tardíos, cuando la célula ya está diferenciada. Del mismo modo MafB se expresa en células α diferenciadas, productoras de glucagón (Artner et al., 2006).

Sobre el programa de diferenciación celular de las células δ y PP no se tiene mucha información. Hoy en día están todavía por determinar los factores de transcripción que intervienen en este proceso.

En la diferenciación terminal de las células del islote intervienen los llamados factores de expresión tardía entre los que se encuentra Pax6, cuya expresión depende directamente de Ngn3 (Figura 3). Pax6 es una proteína homeodominio perteneciente a la familia *paired* que comienza a expresarse en el páncreas en el día embrionario E9 (Sander and German, 1997) y se mantiene tras el nacimiento en los cuatro tipos celulares endocrinos. Pax6 regula los promotores de los genes de insulina, glucagón y somatostatina (Sander et al., 1997) y es por tanto importante tanto en el inicio de la diferenciación como en el mantenimiento del fenotipo celular. Trabajos previos realizados en ratones carentes de Pax6 muestran cómo en estos animales hay una clara deficiencia de todos los linajes celulares endocrinos, así como una completa desorganización del islote pancreático (Sander et al., 1997; St-Onge et al., 1997).

Junto a Pax6, Pdx1 es característico de células diferenciadas. Este factor de transcripción comienza expresándose inicialmente en el endodermo prepancreático pero deja de expresarse en los precursores positivos para Ngn3 (Schwitzgebel et al., 2000). Su

expresión se reactiva en la mayoría de las células β diferenciadas y en algunas de las células δ , donde es esencial para el mantenimiento del fenotipo diferenciado.

En resumen los procesos de diferenciación de los linajes pancreáticos celulares durante la organogénesis se pueden definir siguiendo un modelo en el cual un conjunto específico de factores de transcripción determinan la identidad y función de cada uno de los tipos celulares del islote.

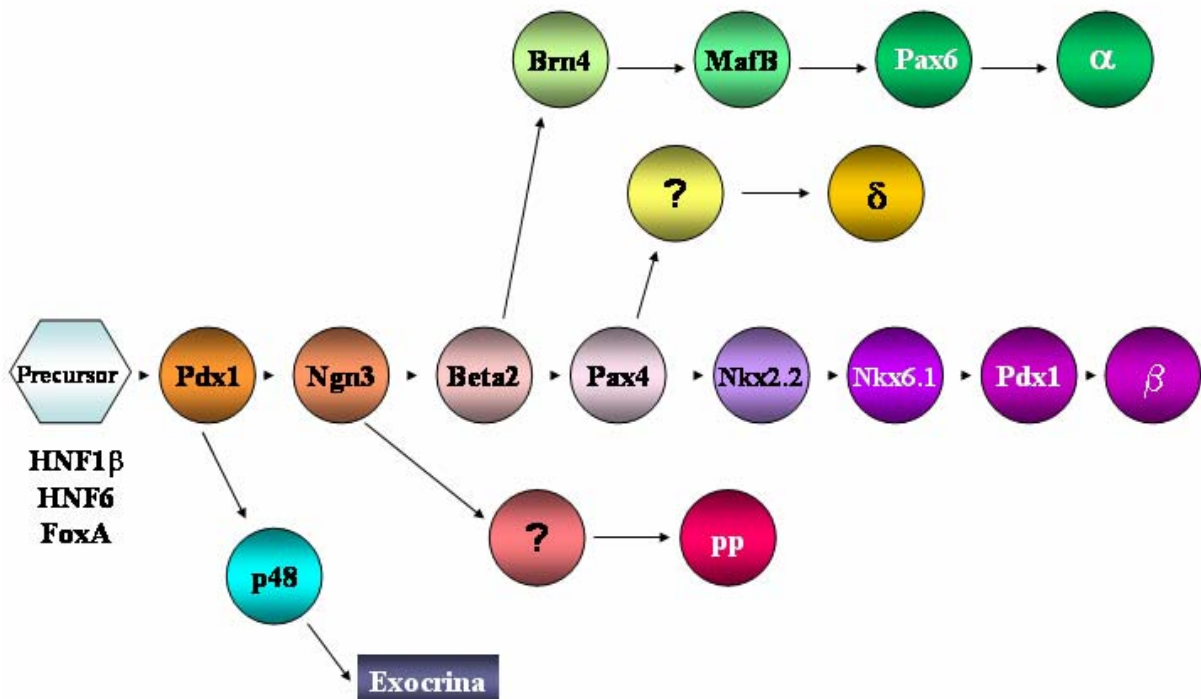


Figura 3: Representación esquemática de la expresión de los factores de transcripción que intervienen en el proceso de diferenciación de cada uno de los linajes pancreáticos.

1.4 Regulación de la expresión de insulina en células β

El gen de insulina se expresa exclusivamente en las células β del páncreas. Al contrario de lo que ocurre en el resto de las especies, en rata y ratón, existen dos genes, insulina I y II. En humanos la localización cromosómica del gen de la insulina es 11p15.5.

La regulación transcripcional del gen de insulina depende de la interacción de factores de transcripción con una serie de secuencias en su promotor, cuya conservación tanto en roedores como en humanos fue ya puesta de manifiesto en los estudios iniciales de Steiner y cols. (1985). Entre estos elementos reguladores parece que los más importantes para la expresión del gen de insulina son las denominadas cajas E, A y RIPE 3b/C1.

Los elementos tipo caja E (E1 y E2), que contienen la secuencia consenso CANNTG, unen proteínas de la familia bHLH cuya función como potentes activadores transcripcionales se debe a la formación de heterodímeros entre factores de transcripción bHLH de clase A (ubícuos) y los de clase B (específicos de un tipo celular). En el gen de insulina I de rata estos elementos reconocen el complejo heterodimérico IEF1, compuesto por una de las proteínas bHLH ubícuas E47 ó su variante E12 (conocidas también como Pan1 y Pan2 respectivamente (Nelson et al., 1990)) y la proteína HEB que también pertenece al grupo de las bHLH (Massari and Murre, 2000). Este complejo interacciona a su vez con Beta2 (Dumonteil et al., 1998). A diferencia del promotor del gen de insulina I de roedores, ni el gen de insulina II ni el humano contienen el elemento E2, aunque en el caso del humano sí existe una secuencia relacionada que une proteínas bHLH (Read et al., 1993).

Los elementos tipo caja A están constituidas por secuencias ricas en adenina y timina a las cuales se unen los factores de transcripción tipo homeodominio. Entre ellos el más conocido es Pdx1, que se expresa en las células β y es el principal transactivador del gen de insulina (Ohlsson et al., 1993; Peers et al., 1994; Petersen et al., 1994).

En el promotor del gen de insulina I existe una región que abarca tan sólo 50 pares de bases que constituye una unidad funcional esencial en la regulación del promotor completo. Esta unidad funcional está compuesta por las cajas E2, A3 y A4 por lo que se le denomina comúnmente como elemento E2A3/4. La caja E2 de este elemento funciona como sitio de reconocimiento para dímeros de proteínas bHLH, incluyendo un heterodímero formado por E47 y Beta2 (Ohneda et al., 2000b). Este dímero actúa sinérgicamente con Pdx1, que se une cooperativamente a la caja A2 e interacciona físicamente con E47/Beta2 (Ohneda et al., 2000b; Qiu et al., 2002). La formación de estos complejos es esencial para la actividad transactivadora de estos factores de transcripción.

La interacción entre E47/Beta2 y Pdx1 está afectada por un numeroso grupo de proteínas de alta movilidad (*high mobility group*; HMG) cuya presencia facilita la unión

de los factores de transcripción al ADN. Así, se ha comprobado que Pdx1 es capaz de reclutar a E47, Beta2 y a la proteína HMGI (Y) para formar un complejo de activación sobre la unidad funcional E2A3/4 (Ohneda et al., 2000b). Además, otros factores de tipo homeodominio como Lmx1 y Cdx3 pueden formar parte de los complejos ensamblados sobre el elemento E2A3/4 (German et al., 1992).

Otro elemento regulador del promotor de insulina es el denominado RIPE3b/C1, (Shieh and Tsai, 1991). Recientemente ha sido identificado el factor de transcripción MafA como un potente transactivador de la expresión del gen de insulina regulada por glucosa (Zhang et al., 2005). Esta proteína posee un dominio básico de cremalleras de leucina y ejerce el efecto transactivador a través de su unión al elemento RIPE3b/C1 (Kataoka et al., 2002). Los animales carentes del gen MafA presentan intolerancia a la glucosa y desarrollan diabetes. Además, se observa una disminución en los mensajeros de genes de insulina I y II, Pdx1 y Beta2, lo cual indica la importancia de MafA sobre la transcripción del gen de insulina y su posible papel como factor de susceptibilidad en humanos para desarrollar diabetes.

Junto a las cajas E, A y RIPE3b/C1 del promotor de insulina existen también otras secuencias reguladoras conocidas como elementos de respuesta a AMPc (CRE). (Crowe and Tsai, 1989; Philippe and Missotten, 1990; Inagaki et al., 1992). El AMPc es un segundo mensajero que regula la transcripción de los genes que portan estos elementos CRE, principalmente a través de la unión del factor de transcripción CREB (proteína de unión a CRE). En esta regulación transcripcional está implicada la proteína quinasa A (PKA) que se encarga de fosforilar CREB. Éste una vez fosforilado interacciona con la maquinaria basal de transcripción gracias a su unión al coactivador CBP (Proteína de unión a CREB) (Daniel et al., 1998). También a estas secuencias reguladoras se une el modulador de CRE, CREM, cuyo gen por un proceso de splicing alternativo genera distintas isoformas que pueden actuar como activadores y/o represores (Foulkes et al., 1991). Los activadores CREM estimulan la transcripción del gen de insulina por su unión directa a los componentes de la maquinaria transcripcional. Los represores CREM, sin embargo, suprimen la transcripción al impedir, por competición, la unión de los activadores CREM o CREB a la maquinaria transcripcional (Inada et al., 1999). De hecho, los islotes aislados de ratas Goto-Kakisaki, un modelo bien caracterizado de rata con diabetes tipo II no obesas, presentaban niveles elevados de ARNm del represor CREM, sugiriendo una potencial contribución al descenso en la transcripción del gen insulina.

El coactivador mejor estudiado es CBP/p300 capaz de interactuar con el dímero E47/Beta2 unido a los elementos E (Eckner et al., 1996) y estimular la transcripción del gen de insulina (Qiu et al., 1998; Sharma et al., 1999). Los trabajos realizados por Stanojevic y cols. (2004) mostraron que CBP/p300 también es capaz de interactuar con Pdx1 y activar la transcripción del gen de insulina. De hecho, en este estudio se muestra que cuando la interacción entre el factor de transcripción y el coactivador se inhibe, queda limitada la producción de insulina y contribuir así al desarrollo de diabetes.

Aunque no es un coactivador específico de la célula β , Bridge1 ha sido bien caracterizado en el contexto del promotor de insulina. Esta proteína está ampliamente expresada en los islotes pancreáticos y funciona como coactivador potenciando la transcripción del gen de insulina I mediada por E47 (Thomas et al., 1999). Asimismo, Bridge1 interacciona físicamente con Pdx1 modulando la función de este factor de transcripción sobre sus genes diana como el de insulina y somatostatina (Stanojevic et al., 2005). Trabajos recientes confirman la importancia de este coactivador como regulador de la homeostasis de la glucosa y de la supervivencia de las células β , ya que la sobreexpresión de Bridge1 en ratones transgénicos supone una déficit en la liberación de insulina y diabetes (Volinic et al., 2006).

Promotor de Insulina I

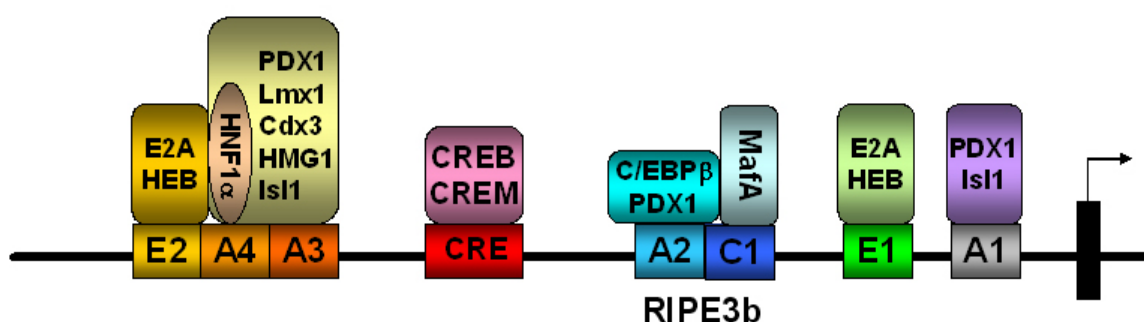


Figura 4: Esquema del promotor de insulina I de roedores. Se representan los elementos reguladores más importantes, así como los factores de transcripción que se unen a ellos para controlar la expresión del gen.

1.5 Fisiopatología de la diabetes mellitus

La diabetes es una enfermedad de incidencia rápidamente creciente, que afecta a 143 millones de personas en todo el mundo, casi cinco veces más que hace 10 años, y la mitad de lo pronosticado para el año 2030. Es una enfermedad grave, ya que en los pacientes diabéticos el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares es de 2 a 4 veces más alto que en el resto de la población. Además la diabetes es causa de enfermedades renales terminales, ceguera y amputaciones de extremidades.

La diabetes constituye un cuadro clínico complejo que se desarrolla como consecuencia de la aparición de un grupo heterogéneo de defectos. En su generación interaccionan factores genéticos y ambientales que producen un desequilibrio entre los niveles de glucosa en sangre y la disponibilidad o acción de la insulina, lo que conlleva una hiperglucemia crónica. Existen dos variedades de la enfermedad, las diabetes tipo I y tipo II.

1.5.1 Diabetes tipo I

La diabetes tipo I es una enfermedad autoinmune crónica y progresiva que se desencadena por la destrucción de las células β . Los pacientes con diabetes tipo I son absolutamente dependientes de insulina exógena. Esta forma de diabetes supone entre un 5 y un 10% de todos los casos.

La enfermedad se inicia con la infiltración de leucocitos en los islotes de Langerhans, seguida de su colonización por células T reactivas, con gran potencial agresivo, que destruyen la mayoría de los islotes pancreáticos, lo que exacerba la respuesta inflamatoria. Los antígenos que desencadenan este proceso destructivo están poco caracterizados aunque recientes trabajos (Nakayama et al., 2005) apuntan a que la propia insulina podría actuar como autoantígeno para inciar el desarrollo de diabetes tipo I. El proceso inflamatorio se inicia y propaga por la acción de citoquinas proinflamatorias (interferón), y por la supresión de citoquinas anti-inflamatorias (IL-4 y IL-10). Todo esto causa una reducción en la función y en masa celular de los islotes. La aportación de insulina exógena puede aminorar los síntomas de la enfermedad endocrina pero no detiene el proceso autoinmune.

Un control riguroso de la glucemia en los pacientes con diabetes tipo I requeriría la regeneración funcional del páncreas dañado. La escasa donación de órganos y tejidos ha alentado la investigación sobre las posibilidades terapéuticas de lo que se ha denominado terapia celular. Mediante este proceso podrían obtenerse células productoras de insulina a partir de células madre para su posterior utilización en pacientes diabéticos (Soria et al., 2001), aunque hasta la fecha esta posibilidad no ha podido hacerse realidad.

1.5.2 Diabetes de tipo II, o diabetes no dependiente de insulina

La diabetes tipo II es una enfermedad poligénica que se caracteriza por la incapacidad de las células β para liberar insulina y/o por la acción deficiente de la insulina sobre los tejidos diana. Por esta razón la administración de insulina exógena no es una pauta terapéutica de elección. Esta enfermedad puede ser considerada como una nueva epidemia en los países industrializados, ya que supone alrededor de un 90% de todos los casos diagnosticados de diabetes. Los hábitos alimentarios preponderantes en la sociedad actual suponen un factor de riesgo importante, pues la obesidad está claramente relacionada con la resistencia periférica que hace insensibles a los tejidos diana a la acción de la insulina.

Un factor importante a destacar es la predisposición genética, entendida como el aumento de la susceptibilidad a padecer la enfermedad cuando existen antecedentes familiares. No obstante, la enorme variabilidad entre diferentes familias y grupos étnicos, así como la compleja base genética de la enfermedad, no han permitido todavía identificar a los genes responsables de la diabetes tipo II.

Como se ha mencionado anteriormente la resistencia a insulina es una característica frecuente en la diabetes tipo II. Es conocido que la mayoría de enfermos de diabetes tipo II son obesos. La resistencia a insulina en pacientes diabéticos y obesos se manifiesta por una disminución en el transporte de glucosa estimulado por insulina en tejidos periféricos, un descenso en el metabolismo de adipocitos y células músculo esqueléticas, así como por un desajuste en la liberación de glucosa hepática.

La relación entre obesidad, resistencia a insulina y diabetes tipo II ha sido objeto de numerosos estudios que han destacado la importancia de varios factores, como los ácidos grasos libres (Boden and Shulman, 2002) y el factor de necrosis tumoral α (TNF-

α) (Peraldi et al., 1998), cuyo exceso parece interferir en la ruta de señalización de insulina, viéndose afectado el transporte de glucosa.

Otras moléculas que también han relacionado la obesidad y la resistencia a insulina son, la leptina, que ejerce un efecto anti-diabético directo y una estimulación aguda del metabolismo de la glucosa (Girard et al., 1997), y la resistina, molécula de señalización secretada por los adipocitos y cuya neutralización potencia la absorción de glucosa inducida por insulina en adipocitos (Steppan et al., 2001).

En la diabetes tipo II se produce un desajuste entre la glucemia y la insulina secretada, lo que conduce a un deterioro adicional de la célula β por sobrecarga que se manifiesta por un descenso en el número de las mismas. Los procesos celulares que intervienen en dicho deterioro se desconocen en detalle, pero se han propuesto diversos mecanismos que incluyen un efecto tóxico producido por el exceso de glucosa (Jonas et al., 1999), lipotoxicidad (McGarry and Dobbins, 1999), y desajuste de la transcripción del gen de insulina debido a la hiperglucemia (Olson et al., 1998). En la actualidad son muchos los trabajos que sugieren que la causa del descenso en la masa de células β ocurre por apoptosis (Butler et al., 2003), desencadenada por procesos asociados a estrés oxidativo (Robertson et al., 2004), o a glucolipotoxicidad (Schrauwen and Hesselink, 2004), entre otros.

1.5.3 Diabetes tipo MODY

La diabetes MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*) es una forma monogénica de diabetes mellitus estrechamente relacionada, desde el punto de vista clínico, con la diabetes tipo II. La diabetes tipo MODY constituye un grupo genéticamente heterogéneo porque se produce como consecuencia de distintas mutaciones monogénicas. Se caracteriza por manifestarse antes de los 25 años de edad, y por su carácter familiar con transmisión autonómica dominante (Froguel and Velho, 1999). Se ha estimado que entre el 2% y el 5% de los pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo II padecen esta forma de diabetes, que se caracteriza por un defecto en la secreción de insulina estimulada por glucosa. Hasta el momento se conocen seis tipos de diabetes tipo MODY que se asocian a mutaciones en genes concretos. Las mutaciones afectan, excepto en el caso de la diabetes MODY2, a genes que codifican factores de transcripción.

1.5.3.1 Tipos de diabetes MODY

MODY1: Se debe a una mutación en el gen que codifica HNF4 α (Factor Hepático Nuclear 4 α), miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas. Esta mutación produce un desacoplamiento entre la estimulación de la célula β inducida por glucosa y la cantidad de insulina liberada, que resulta insuficiente (Yamagata et al., 1996a). El déficit completo de HNF4 α en ratón produce letalidad embrionaria debido a defectos en la gastrulación (Chen et al., 1994), lo que pone de manifiesto el relevante papel de este factor de transcripción en los procesos de desarrollo y diferenciación.

HNF4 α se expresa en los islotes pancreáticos y en líneas de insulinoma (Miquerol et al., 1994), además de ser un factor importante para el desarrollo hepático y como regulador de la expresión de genes específicos de hepatocitos (Sladek 1994). Trabajos realizados en una línea celular de insulinoma, INS-1, muestran que la expresión de un mutante dominante negativo para HNF4 α da lugar a alteraciones en la liberación de insulina estimulada por nutrientes (Wang et al., 2000). Además, la inducción de este dominante negativo causa una disfunción mitocondrial que se manifiesta por una reducción en la oxidación de piruvato, una atenuación en la hiperpolarización de la membrana mitocondrial y una reducida producción de ATP celular (Wang et al., 2000).

MODY2: Es el único tipo de diabetes MODY en el que las mutaciones que la producen no afectan a un factor de transcripción, sino al gen de la glucokinasa (Froguel et al., 1993). La glucokinasa es sintetizada tanto en hepatocitos como en células β pancreáticas y juega un papel esencial en la regulación e integración del metabolismo de la glucosa. Las mutaciones tienen como consecuencia la producción de una enzima defectuosa que altera la capacidad de las células β para detectar el incremento en los niveles de glucosa en sangre dando lugar a estados de hiperglucemia que no se acompañan de la correspondiente secreción de insulina.

Grupe y cols. (1995) generaron ratones deficientes en glucokinasa y ratones transgénicos en los cuales la glucokinasa se expresa únicamente en células β . Estos trabajos demostraron que una sola copia del gen de glucokinasa es suficiente para elevar la glucosa sanguínea y disminuir la secreción de insulina. Por el contrario en los ratones deficientes se produce una hiperglucemia que produce la muerte perinatal de los

animales. Se observó también que la expresión de glucokinasa únicamente en células β , en ausencia de expresión en hígado, es suficiente para evitar la letalidad.

MODY3: Este subtipo se debe a una mutación en el gen que codifica el factor de transcripción HNF1 α , involucrado en la regulación de genes hepáticos, entre los que se encuentran los implicados en el metabolismo de la glucosa, colesterol y ácidos grasos. También se expresa en el páncreas, y en humanos la mutación de uno de sus alelos da lugar a una secreción anómala de insulina, demostrando así la importancia de este factor de en la función de la célula β (Yamagata et al., 1996b).

Los trabajos realizados sobre ratones carentes de HNF1 α han mostrado que los animales heterocigotos son aparentemente normales pero los homocigotos son de menor tamaño, estériles, presentan anomalías en la función hepática y desarrollan fenilcetonuria (Pontoglio et al., 1996). Además estos ratones desarrollan glucosuria, debido a una disfunción renal y padecen diabetes debido a una disfunción en la secreción de insulina en respuesta a glucosa (Lee et al., 1998; Pontoglio et al., 1998).

MODY4: Se desarrolla como consecuencia de mutaciones en Pdx1. Stoffers y cols. (1997) describieron el caso de un niño con agénesis pancreática debida a una mutación en homocigosis del gen Pdx1. La mutación en heterocigosis supone el desarrollo de diabetes tanto en humanos como en roedores (Stoffers et al., 1997b; Ahlgren et al., 1998; Hani et al., 1999; Macfarlane et al., 1999). En concreto en ratones se reduce la expresión del transportador de glucosa GLUT2 causando hiperglucemia. Por otro lado Brissova y cols. (2002) aparte de confirmar el descenso en la expresión de GLUT2, mostraron que estos animales exhiben una secreción reducida de insulina en los tests de tolerancia a glucosa y que tanto la expresión de Pdx1, como la generación de NADPH y la función mitocondrial está afectada.

Trabajos recientes realizados sobre islotes aislados de ratones con uno de los alelos mutados para Pdx1 mostraron que a pesar de que la secreción de insulina en respuesta a glucosa es normal, estos islotes presentan una mayor proporción de células en apoptosis, así como una arquitectura anómala (Johnson et al., 2003).

MODY5: En este subtipo se encuentra mutado el gen que codifica HNF1 β , regulador transcripcional relevante para la morfogénesis y diferenciación de las células pancreáticas (Coffinier et al., 1999). Los embriones de ratón con los dos alelos mutados no progresan mas allá del estado de blastocisto (Barbacci et al., 1999). Debido a que los ratones homocigotos no son viables, se han utilizado animales con una delección

selectiva de HNF1 β en las células β . Estos animales presentan intolerancia a la glucosa y secreción anómala de insulina que empeora progresivamente con la edad. Además, los islotes que carecen de HNF1 β presentan un aumento en el ARNm de HNF1 α y Pdx1, un descenso en los niveles del ARNm de HNF4 α y una reducción en la liberación de insulina estimulada por glucosa. Es decir, HNF1 β está involucrado en la regulación de factores de transcripción específicos de célula β y es necesario para la capacidad de la célula pancreática de responder a glucosa (Wang et al., 2004).

MODY6: En este caso las mutaciones, en heterocigosis, afectan al gen que codifica Beta2. Trabajos realizados por Malecki y cols. (1999) demostraron que en humanos se desarrolla diabetes cuando hay una mutación bien del dominio de unión a ADN, o bien del dominio de transactivación, necesario para su interacción con el coactivador CBP/p300. Asimismo, estos pacientes presentan islotes pancreáticos con una morfología anormal y una reducción de la masa de células β . Los estudios realizados en ratones mostraron que la delección completa de Beta2 da lugar a la muerte de los animales a los cinco días después de su nacimiento debido a la hiperglucemia que se desarrolla como consecuencia de que sólo se genera un 5% de los niveles normales de insulina (Naya et al., 1997). Sin embargo, la delección de uno solo de sus alelos supone un nivel de supervivencia del 60% de los animales mas allá del estado neonatal (Huang et al., 2002), produciéndose un incremento significativo en la masa de las células β , a través de un proceso de neogénesis, aunque sin recuperar la arquitectura normal del islote.

1.5.3.2. Mecanismos fisiopatológicos

En condiciones normales la liberación de insulina depende de la generación de niveles adecuados de Ca²⁺ y ATP en las células β . Recientes estudios experimentales sugieren que la disminución de la secreción de insulina inducida por glucosa en pacientes con diabetes tipo MODY puede deberse a una disminución en la síntesis de ATP en la mitocondria. Sin embargo, aún no está claro cómo esta posible afectación mitocondrial se relaciona con el hecho de que la etiología de casi todas los MODY se debe a mutaciones en factores de transcripción nucleares.

Trabajos realizados en ratones carentes de Pdx1 (Gauthier et al., 2004) muestran la existencia de una reducción en la secreción de insulina en respuesta a glucosa, leucina y arginina.

En un intento para esclarecer las dianas moleculares implicadas en la secreción dependiente de Pdx1 de insulina se observó que en ausencia de Pdx1 se reduce al 50% la expresión del gen mitocondrial *nd1*, que codifica una subunidad del complejo I de la cadena respiratoria, NADH deshidrogenasa. Este hecho tiene como consecuencia una drástica reducción (75%) en la concentración de ATP celular, explicando la escasa secreción de insulina estimulada por glucosa. Otro dato importante obtenido en estos estudios fue que TFAM, un factor de transcripción nuclear que se transloca a la mitocondria importante para el mantenimiento de genes mitocondriales, está reprimido en los islotes deficientes en Pdx1. El hecho de que una subunidad mitocondrial de la enzima NADH deshidrogenasa fuera inhibida por la represión de Pdx1 les llevó a preguntarse si TFAM podría ser una diana directa de Pdx1. Así los autores demostraron que la pérdida de Pdx1 altera la expresión de genes mitocondriales a través de la regulación de TFAM dando lugar a una secreción anómala de insulina (Gauthier et al., 2004).

Por tanto, la supresión de Pdx1 tiene consecuencias importantes sobre la actividad mitocondrial de la célula β (Gauthier et al., 2004). Los datos sugieren que esta función mitocondrial anómala en la variante MODY4 podría explicar los defectos en la secreción de insulina, así como el descenso en la masa de células β .

Pagliarini y cols. (2005) silenciaron el gen de la fosfatasa mitocondrial PTPMT1 en una línea celular de insulinoma de rata (INS-1), lo que proporcionó un marcado incremento de la producción ATP celular y una marcada potenciación de la secreción de insulina bajo condiciones tanto basales como estimuladas por glucosa. Teniendo en cuenta que la secreción de insulina está íntimamente relacionada con la concentración de ATP celular, estos datos sugieren un posible nuevo punto de control mitocondrial en la regulación de la secreción de insulina en las células β y define a PTPMT1 como una posible diana terapéutica para la diabetes de tipo II.

Junto a los niveles de ATP celular, los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos también están íntimamente relacionados con la secreción de insulina. Las células β de ratón poseen varios tipos de canales de calcio. Trabajos recientes (Schulla et al., 2003) en los que se suprimió específicamente en las células β el gen que codifica los canales de tipo

L mostraron que se altera la secreción de insulina y se desarrolla una intolerancia a glucosa. Por ello los genes que están involucrados con los procesos de exocitosis (por ejemplo los canales de calcio) podrían considerarse como genes candidatos para futuros estudios de la diabetes tipo II.

Todos estos estudios demuestran la enorme importancia de los factores de transcripción pancreática y su estrecha relación con la diabetes. Así influyen en procesos tan aparentemente dispares como el desarrollo embrionario de los islotes, la regulación de la transcripción de los genes que codifican las hormonas pancreáticas, y el control de la secreción de insulina.

1.6 ALX3

Alx3 es un factor de tipo homeodominio que pertenece a la familia de homeodominios tipo *paired*. Uno de los subtipos de homeoproteínas *paired* está caracterizado por la presencia de un dominio conservado localizado en el extremo carboxilo-terminal denominado OAR o dominio *aristaless*. Este grupo incluye Prx1, Prx2, Alx3, Alx4 y Cart1, que están altamente relacionados tanto estructural como funcionalmente. Los genes de la familia *aristaless* exhiben patrones de expresión solapantes durante el desarrollo de los tejidos que incluyen el mesénquima craneal derivado de la cresta neural, los arcos branquiales, el mesodermo lateral y el primordio de las extremidades.

Alx3 se expresa en embriones de ratón a partir de los 8 días de gestación. Su expresión es predominante en el mesénquima derivado de la cresta neural y en el mesodermo lateral. Los trabajos de ten Berge y cols. (1999), detectaron su expresión en el mesénquima de la cabeza y en el primero y segundo arco faríngeo así como en la cola y en muchas de las estructuras derivadas de la placa lateral del mesodermo incluyendo las extremidades, la pared abdominal y el tubérculo genital.

Algunas de las funciones de los genes que codifican factores de transcripción tipo *aristaless* han sido estudiadas en ratones que portaban alelos mutantes. Concretamente, la inactivación de Cart1 causa defectos en la formación del esqueleto craneofacial y en el cierre del tubo neural produciendo acrania y meroanencefalia. Los ratones con mutación en el gen Alx4 tienen defectos craneales, en la pared abdominal y

polidactilia. Con respecto a Alx3, en los animales carentes del gen no se ha descrito, hasta el momento, ninguna alteración morfológica (Beverdam et al., 2001), aunque sí se sugiere una posible redundancia funcional entre Alx3 y Alx4. Precisamente los animales que carecen tanto de Alx3 como del gen Alx4 muestran severas anomalías craneofaciales, que están ausentes en los animales carentes de Alx4. Además la mayoría de los huesos faciales y otras estructuras derivadas de la cresta neural presentan malformaciones o incluso están ausentes (Beverdam et al., 2001).

Alx3 fue inicialmente identificado como un fragmento expresado en la línea de insulinoma de hamster HIT-T15 (Rudnick et al., 1994), en un estudio diseñado para detectar factores de transcripción importantes para el desarrollo y/o la función de la célula β . Sin embargo, su expresión en el páncreas y su posible papel como regulador de la transcripción de insulina no fue documentado. La presente tesis doctoral describe trabajos encaminados a investigar esta posibilidad.

OBJETIVOS

La hipótesis a evaluar en el trabajo que constituye la presente tesis doctoral es que Alx3 participa en los mecanismos que regulan la producción de insulina y el mantenimiento de la homeostasis glucémica.

Para evaluar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Determinar la expresión de Alx3 en las células de los islotes de Langerhans.
2. Determinar el posible papel de Alx3 en la regulación de la expresión del gen de insulina en células β .
3. Determinar la participación de Alx3 en los mecanismos que regulan el mantenimiento de la glucemia *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVOS CELULARES

Se han utilizado las siguientes líneas celulares: MIN6, RIN-1027-B2, RC2.E10, COS7, Hela y BHK21. A continuación se describen las características más relevantes de cada una de ellas.

3.1.1 MIN6

La línea celular MIN6 deriva de insulinoma de ratón, y fue cedida por el Dr. Jorge Ferrer (Hospital Clínico de Barcelona). Esta línea celular presenta un fenotipo característico de célula β (Asfari et al., 1992). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dubelco (DMEM) (Gibco) complementado con suero fetal bovino (15%) inactivado por calor, fungizona (1%), penicilina/estreptomicina (1%) (Gibco), y β -mercaptoetanol (70 μ M). No se utilizaron por encima del pasaje número 35. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37 °C en una atmósfera que contiene 5% de CO₂.

3.1.2 RIN-1027-B2

Las células RIN-1027-B2 derivan de un insulinoma de rata y son productoras de somatostatina (Philippe et al., 1987). Se cultivaron en medio DMEM con suero fetal bovino (10%) a una temperatura de 37 °C en una atmósfera que contiene 5% de CO₂.

3.1.3 RC2.E10

Las células RC2.E10 constituyen una línea monoclonal establecida en nuestro laboratorio a partir de cultivos primarios de corteza cerebral de ratas de 16 días de gestación (E16) (Schwartz and Vallejo, 1998). Se cultivaron en DMEM complementado con suero fetal bovino (10%) inactivado por calor, fungizona (1%) y penicilina/estreptomincina (1%), en placas tratadas previamente durante 15 minutos con poli-D-ornitina (15 μ g/ml) (Sigma). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 33 °C en una atmósfera que contiene 5% de CO₂.

3.1.4 Otras líneas celulares

Las células COS7 (ATCC CRL-1651) derivadas de riñón de mono, HeLa (ATCC CCL1) derivadas de un tumor uterino humano y BHK21 (ATCC CCL10) que corresponden a fibroblastos de riñón de hamster (*baby hamster kidney fibroblasts*), se cultivaron en medio DMEM, complementado como se indica en el apartado anterior, a una temperatura de 37 °C en una atmósfera que contiene 5% de CO₂.

3.2. PLÁSMIDOS

3.2.1 Plásmidos que incorporan fragmentos del promotor de insulina

Los plásmidos que incorporan segmentos del promotor de insulina utilizados en el presente estudio controlan la expresión del gen testigo cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y son los siguientes:

INSCAT: Codifica un fragmento del promotor del gen de insulina I de rata que comprende los nucleótidos -410 a +34 (Philippe and Missotten, 1990).

5FFCAT1: Contiene 5 copias multimerizadas del elemento E2A3/4 del gen de insulina I de rata (cedido por la Dra. Melissa Thomas, Massachussets General Hospital, Boston).

3.2.2 Vectores de expresión en células eucariotas

pcDNA3-Alx3: Contiene el cDNA completo de Alx3 de rata clonado en el plásmido de expresión pcDNA3 (Pérez-Villamil et al., 2004).

Plásmidos que codifican versiones modificadas de Alx3: Se generaron mediante mutagénesis dirigida en sitios específicos del cDNA, según se describe en detalle por Pérez-Villamil y cols. (2004). Así, los plásmidos pcDNA3-Alx3₅₇, pcDNA3-Alx3₉₁ y pcDNA3-Alx3₁₄₃ codifican versiones de Alx3 que carecen de segmentos crecientes de su extremo amino terminal. Los plásmidos pcDNA3-Alx3₁₋₂₂₈ y pcDNA3₁₋₂₇₉ codifican versiones de Alx3 que carecen de los segmentos correspondientes de su extremo carboxilo terminal. Finalmente, el plásmido pcDNA3₁₄₃₋₂₂₈ codifica un polipéptido que corresponde al homeodominio de Alx3. En la figura 5 se representan esquemáticamente las versiones de Alx3 codificadas por estos plásmidos.

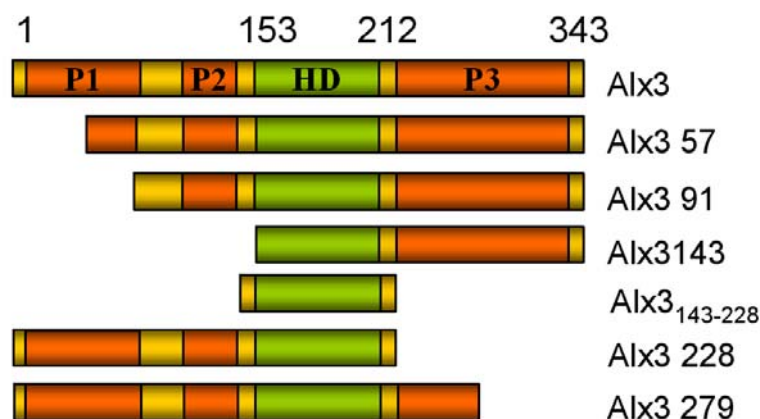


Figura 5: Representación esquemática de las versiones truncadas de Alx3. P1, P2 y P3 indican dominios ricos en prolina y HD corresponde al homeodominio.

pcDNA3-PDX1: Contiene el cDNA completo que codifica PDX1 de rata (Miller et al., 1994) clonado dentro de los sitios *HindIII* y *NotI*, de pcDNA3.

pCMV-Beta2: Contiene el cDNA que codifica Beta2 de hamster (Naya et al., 1995). Este plásmido se utilizó en los ensayos de transfección transitoria, y fue cedido por el Dr. Jorge Ferrer (Hospital Clínico de Barcelona).

pcDNA3-Beta2: Contiene el cDNA de Beta2 de ratón clonado en el vector de expresión pcDNA3 (Pérez-Moreno et al., 2001). Fue proporcionado por la Dra. Amparo Cano (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid). Se utilizó para sintetizar Beta2 en extractos de reticulocito de conejo *in vitro*.

pCMV-Pan1: Contiene el cDNA de Pan1, homólogo de E47 en rata (Ohneda et al., 2000b), clonado en el vector de expresión pCMV (Nelson et al., 1990). Este plásmido se utilizó en los ensayos de transfección transitoria.

pcDNA3-E47: Contiene el cDNA de E47 clonado en el plásmido de expresión pcDNA3. Fue proporcionado por la Dra. Amparo Cano (Pérez-Moreno et al., 2001). Se utilizó para sintetizar E47/Pan1 en extractos de reticulocito de conejo *in vitro*.

pZeoSV2-E47: Contiene el cDNA completo de E47/Pan1 clonado en el vector pZeoSV2 (Invitrogen).

Plásmidos que codifican versiones modificadas de E47/Pan1: Se generaron mediante mutagénesis dirigida en sitios específicos del cDNA. Los plásmidos E47₉₁, E47₃₃₄ y E47₅₄₉ codifican versiones de E47 que carecen de segmentos crecientes de su extremo amino terminal. Estos plásmidos fueron cedidos por la Dra. Amparo Cano (Instituto de Investigaciones Biomédicas) (Figura 6).

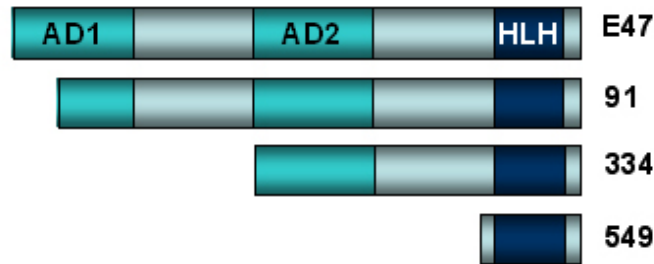


Figura 6: Representación esquemática de las versiones truncadas de E47/Pan1

pCMV2N3TCBP: Contiene el cDNA completo del coactivador CBP (*CREB binding protein*) clonado en el vector pCMV (Ramirez et al., 1997).

3.2.3 Vectores de expresión en células procariotas

GST-Alx3: Codifica una proteína quimérica compuesta por un fragmento de GST (Glutathione S-transferasa) fusionado a Alx3. Fue construido mediante la introducción del cDNA de Alx3 en los sitios *BamHI* y *HindIII* del plásmido PGEX-KG (Pérez-Villamil et al., 2004).

GST-Alx3₁₄₃₋₂₂₈: Codifica una proteína quimérica compuesta por un fragmento de GST fusionado al polipéptido correspondiente al homeodominio de Alx3. Este polipéptido se clonó en el sitio *NcoI* del plásmido pGEX-KG.

GST-E47 Codifica una proteína quimérica compuesta por un fragmento de GST fusionado al cDNA de E47 clonado en el vector pGEX4T1 (Laboratorios Amersham Pharmacia Biotech). Fue proporcionado por la Dra. Amparo Cano (Pérez-Moreno et al., 2001).

3.3 TRANSFECCIONES

Todas las transfecciones se realizaron por duplicado y se repitieron un mínimo de tres veces. En todos los casos la actividad cloranfenicol acetiltransferasa se determinó 48 horas después de la transfección tal y como describen Seed y cols. (1998). Los resultados obtenidos representan la media de un mínimo de al menos tres experimentos independientes. En las gráficas se representa la media \pm el error estándar de las muestras.

3.3.1 Células MIN6

Las células MIN6 se sembraron a una densidad de 1×10^6 células por placa, en placas de 60 mm de diámetro. Tras 16 horas, las células se incubaron durante 6 horas en presencia de 5 μ g de plásmido testigo, 2 μ g de los vectores de expresión y 20 μ l de Lipofectamina (Gibco), en 1 ml de medio sin suero por placa. Transcurridas 6 horas, se añadieron 3 ml de medio completo.

3.3.2 Células HeLa, COS7 y BHK21

Estas líneas celulares se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de 5×10^5 células por placa y se transfectaron con 10 μ g de plásmido testigo y 2 μ g de vectores de expresión. Para obtener los precipitados de fosfato cálcico se añadieron al ADN plasmídico, 75 μ l de CaCl_2 1 M y agua hasta un volumen final de 300 μ l. Esta mezcla se añadió a 300 μ l de tampón HBS 2X (NaCl 300 mM, Hepes 50 mM, Na_2HPO_4 1.5 mM). Los precipitados permanecieron en contacto con las células durante 16 horas, tras las cuales se lavaron y se les añadió medio fresco.

3.4 WESTERN INMUNOBLOT

Se prepararon extractos nucleares de las distintas líneas celulares según el protocolo de Schreiber y cols. (1989). Las muestras se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando 10 μ g por carril. Tras la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La inmunoreactividad de Alx3 se detectó mediante incubación con un antisuero primario policlonal de conejo

(Pérez-Villamil et al., 2004) (dilución 1:5000), a lo que siguió la incubación con un anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1:10000) (Laboratorios Jackson). La banda inmunoreactiva se visualizó usando un sistema de detección quimioluminiscente (ECL; Amersham, Buckinghamshire, England).

3.5 INMUNOCITOQUÍMICA

Los estudios inmunocitoquímicos se realizaron sobre las líneas celulares MIN6 y RIN-1027-B2, sembradas en placas de 35 mm a una densidad de 1×10^6 y 5×10^5 células/placa, respectivamente. Las células se fijaron durante 5 minutos con una solución de paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada (pH 7.4) y se permeabilizaron en metanol frío ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 2 minutos.

Tras lavar las células en solución salina tamponada y tritón al 0.2%, se las incubó durante 1 hora en una solución de bloqueo que contiene suero normal de cabra al 5%. Transcurrido el período de bloqueo, las células se incubaron durante 16-20 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con el antisuero anti-Alx3 (dilución 1:4000).

Las células se lavaron nuevamente en solución salina tamponada y tritón al 0.2%, tras lo cual se añadió a las placas una solución de H_2O_2 al 1% durante 30 minutos para bloquear la peroxidasa interna. Tras sucesivos lavados se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-conejo generado en cabra conjugado con biotina (Laboratorios Vector) utilizado a una dilución 1:500. Se lavaron de nuevo las placas, en este caso con solución salina tamponada sin tritón, y se procedió a la incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente con el complejo ABC (Vectastain Elite Kit, Vector) diluido según las instrucciones del fabricante.

El revelado de la reacción se llevó a cabo mediante la utilización de diaminobenzidina (DAB) (Laboratorios Vector), para lo cual las células se incubaron durante unos minutos en una solución de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina al 0.03% y H_2O_2 al 0.01 % (v/v) en solución salina tamponada. Las muestras se montaron con Glicergel (DAKO) y se analizaron en un microscopio óptico provisto de una cámara digital.

3.6 INMUNOHISTOQUÍMICA

3.6.1 Inmunohistoquímica simple

Para los estudios inmunohistoquímicos utilizamos embriones de ratas Wistar de diferentes edades de gestación y los fijamos durante 16-20 horas en paraformaldehído al 4%. Transcurrido este tiempo los transferimos a una solución de sacarosa al 20% en solución salina tamponada donde se mantuvieron al menos 24 horas. Se realizaron secciones de 10 µm en criostato que se mantuvieron a -80 °C hasta ser utilizadas. En ese momento las preparaciones se descongelaron a temperatura ambiente y se permeabilizaron con metanol a -20 °C durante 2 minutos.

Además, se realizaron estudios sobre páncreas adulto de ratas Wistar (200-250 gramos de peso). Los animales se anestesiaron con Ketolar (1 µl/g), se les abrió la cavidad torácica y fueron perfundidos con paraformaldehído al 4% mediante punción cardiaca. Una vez extraído el páncreas se fijó durante 16-20 horas en esta solución. Tras la fijación el páncreas se transfirió a una solución de sacarosa al 20% en solución salina tamponada donde permaneció al menos 24 horas a 4 °C. Se realizaron secciones de 20 µm en criostato que se mantuvieron a -80 °C hasta su utilización, momento en el cual se descongelaron y se permeabilizaron durante 2 minutos en metanol a -20 °C.

Tanto en el caso de los embriones como en el de páncreas adulto el procedimiento de incubación con el antisuero anti-Alx3 fue idéntico al descrito para las células MIN6 y RIN-1027-B2 en el apartado anterior, siendo la única excepción el sistema de montaje, pues estas preparaciones se deshidrataron y se montaron con DEPEX.

3.6.2 Inmunohistoquímica de doble antígeno

Para determinar si Alx3 se expresa en células productoras de insulina, somatostatina y glucagón, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica de doble antígeno.

En todos los casos se procedió en un primer lugar a detectar Alx3, tal y como se ha explicado en el apartado anterior. La inmunodetección de Alx3 se realizó añadiendo cloruro de níquel a la diaminobenzidina, para conseguir que los núcleos de las células positivas para Alx3 se tiñan en gris oscuro.

Una vez terminada esta primera fase, se lavaron repetidas veces las muestras con solución salina tamponada y se incubaron con avidina (1 mg/ml) durante 45 minutos. Una vez realizado este bloqueo se lavaron nuevamente y se incubaron con biotina (1 mg/ml) durante 30 minutos. A continuación se bloqueó la actividad peroxidasa residual mediante incubación con una solución al 1% de H₂O₂. Tras nuevos lavados se procedió a añadir el suero control no inmune, que minimiza la unión inespecífica de los antisueros secundarios. Este bloqueo se realizó con el suero diluido al 5% durante 30 minutos. A continuación se procedió a incubar las preparaciones con los antisueros correspondientes a insulina, glucagón o somatostatina siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. Los antisueros empleados son los siguientes:

- Antisuero anti-insulina humana obtenido en cobaya (Linco Resarch) dilución 1:100.
- Antisuero anti-glucagón obtenido en cobaya (Linco Resarch) dilución 1:100.
- Antisuero monoclonal anti-somatostatina (Laboratorios Acris) dilución 1:100.

En la inmunodetección de estas hormonas se empleó diaminobenzidina sin níquel, de modo que las células quedan teñidas de un color parduzco que permite diferenciarlas de la inmunodetección de Alx3.

3.7 ENSAYOS DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL

Los ensayos de retardo de la movilidad electroforética en gel (EMSA, electroforetic mobility shift assay), se llevaron a cabo utilizando extractos nucleares de células MIN6 preparados según el protocolo descrito por Schreiber y cols. (1989), o con factores de transcripción sintetizados *in vitro*, utilizando un sistema de extractos de reticulocitos de conejo (Promega). La concentración de proteínas fue determinada mediante la técnica del Bradford utilizando un kit específico (Bio-Rad protein assay), y albúmina bovina como estándar.

Para generar las sondas, se emplearon oligonucleótidos de doble cadena con extremos cohesivos GATC que se marcaron mediante incubación con ADN polimerasa Klenow y los deoxinucleótidos dCTP, dTTP y dGTP en presencia de ³²P-dATP. Una vez marcados, los oligonucleótidos (10000-20000 cpm) se incubaron a temperatura

ambiente durante 20 minutos con los extractos nucleares (5-10 µg de proteína), o con los factores de transcripción sintetizados *in vitro*, en presencia de 2 µg de ácido poli(dI-dC) (Sigma), KCl 70 mM, DTT 1 mM, EDTA 0.3 mM, y glicerol al 10%. En todas las reacciones se añadieron inhibidores de proteasas, pepstastina A (1 mg/ml), leupeptina (10 mg/ml), aprotinina (10 mg/ml) y p-aminobenzidina (0.1 mM).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en estos ensayos se detallan a continuación:

SONDA	SECUENCIA
A2	5'- GATCCGAGCCCTTAATGGGCAAAA-3'
A3/4	5'- GATCCTGTTAATAATCTAATTACCCTAGA-3'
E2A3/4	5'-GATCCATCAGGCCATCTGGCCCCTTGTTAATAATCTA ATTACCCTAGA-3'

Asimismo, se añadieron a la mezcla de reacción antisueros específicos que reconocen algunos de los factores de transcripción unidos a los diferentes oligonucleótidos o el correspondiente suero control no inmune. Los antisueros específicos utilizados fueron:

- Anti-Alx3 generado en nuestro laboratorio
- Anti-Pdx1 253, dirigido contra el extremo carboxilo- terminal (Stoffers et al., 1997a).

La reacción se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual las muestras se resolvieron en un gel de acrilamida al 6%. La interacción ADN-proteína se detectó mediante autorradiografía.

3.8 ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se realizaron para demostrar la unión de Alx3 al gen de insulina endógeno *in vivo* en células MIN6 y en islotes pancreáticos.

En el caso de las células MIN6, las células se trataron con formaldehído al 1 % para inducir la formación de enlaces covalentes en la cromatina, tras lo cual se procedió

a su lisis y sonicación. El tamaño de los fragmentos de cromatina (aproximadamente 100-600 pares de bases) se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

De la muestra generada, se tomaron 20 µl considerados como *input* para su posterior análisis por PCR. El resto (180 µl) se diluyó por un factor de dilución de 10 en solución IP, cuya composición es la siguiente: tritón X-100 al 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM e inhibidores de proteasas. A continuación, para eliminar posibles uniones inespecíficas, se dividió cada muestra (1.8 ml) en dos alícuotas iguales, a cada una de las cuales se les añadieron 80 µl de una solución denominada A que contiene proteína A acoplada a cuentas de Sefarosa (50%), 10 µg de esperma de salmón sonificado, y 1 mg/ml de albúmina bovina. Todo ello se incubó durante 1 hora con agitación constante a 4 °C. Transcurrido ese tiempo se centrifugaron las muestras y se tomaron los sobrenadantes, los cuales se utilizaron para inmunoprecipitar. La inmunoprecipitación se llevó a cabo añadiendo 10 µl de antisuero anti-Alx3 o igual cantidad de suero no inmune de conejo. Tras 16 horas de incubación a 4 °C, se añadieron a cada muestra 50 µl de solución A para recuperar los complejos inmoprecipitados. Una vez centrifugadas las muestras, las cuentas de Sefarosa-proteína A se lavaron 5 veces con distintas soluciones: la primera contiene tritón X-100 al 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM e inhibidores de proteasas. El segundo lavado se hizo con una solución similar que contiene NaCl 500 mM. La solución utilizada para el tercer lavado contiene LiCl 0.25 M, IGEPAL al 1%, desoxicolato al 1%, EDTA 1mM y Tris-HCl 10 mM (pH 8.0). Por último las muestras se lavaron dos veces con una solución de TE (Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) y EDTA 1mM). Los complejos se recuperaron añadiendo 500 µl de SDS al 1% en NaHCO₃ 0.1 M, a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, con el fin de romper los enlaces formados, se añadieron 20 µl de NaCl 5 M a las muestras y se incubaron durante 4 horas a 65 °C. El ADN se extrajo con fenol-cloroformo, y después se precipitó con etanol en presencia de 20 µg de glicógeno a -20 °C durante 16 horas. El ADN precipitado se resuspendió en 10 µl de agua, y se empleó para la amplificación tanto de un fragmento del promotor de insulina I como de insulina II de ratón mediante PCR.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores es la siguiente:

mInsI Directo 5'-ATATTAGGTCCCTAACAACTGCAGT-3'

mInsI Inverso 5'- TACTGGATGCCCACCAGCTTTATAG-3'

Aunque los genes de insulina I y II son prácticamente idénticos, estos cebadores amplifican sólo el gen de insulina I debido a que el extremo 3' del cebador directo corresponde a una inserción de 5 nucleótidos específica de este gen, que está ausente en el gen de insulina II.

Para amplificar el gen de insulina II de ratón se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

mInsII Directo: 5'-CAAAGATACTAGGTCCCCAACTG-3'

mInsII Inverso: 5'-CCACTACCTTTATAGACCAAAGC-3'

En este caso el extremo 3' del cebador directo corresponde a una inserción de 3 nucleótidos ausente en el gen de insulina I de ratón. La especificidad de los fragmentos amplificados se determinó mediante la digestión con las enzimas *AatII* y *PstI*, las cuales cortan únicamente el fragmento amplificado del gen de insulina II.

Las condiciones de PCR tanto para el gen de insulina I como para el gen de insulina II fueron: 95 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C. Tras finalizar el último ciclo las muestras se mantuvieron durante 5 minutos a 72 °C.

Como control usamos secuencias del promotor del gen de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PCK) (nucleótidos -434 a -96) como indican Cissel y cols. (2003). La secuencia de los oligonucleótidos de PCK es la siguiente:

PCK Directo: 5'- GAGTGACACCTCACAGCTGTGG 3'

PCK Inverso: 5'- GGCAGGCCTTTGGATCATAGCC-3'

En este caso las condiciones de PCR fueron: 2 minutos a 95 °C, seguido de 28 ciclos de: 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 61 °C y 30 segundos a 72 °C. La reacción finalizó con una incubación de 5 minutos a 72 °C.

En el caso de los islotes pancreáticos, utilizamos cromatina preparada a partir de islotes aislados de páncreas de ratón, cedidos por el Dr. Jorge Ferrer (Hospital Clínico de Barcelona). En este caso el procedimiento fue idéntico al descrito para las células MIN6, con la excepción de que sólo se evaluó la unión de Alx3 al gen de insulina I de ratón.

Para investigar la interacción entre E47/Pan1 y Alx3, se transfectaron células Hela con INSCAT y pcDNA3-Alx3 en presencia de pcDNA3-E47 o del vector vacío pcDNA3. La inmunoprecipitación de E47 se llevó a cabo 48 horas después con un antisuero específico policlonal de conejo (sc-763, Santa Cruz Biotechnology) utilizando IgG como control, a partir de cromatina preparada como se ha descrito anteriormente en este apartado. La PCR se llevó a cabo utilizando oligonucleótidos correspondientes a la secuencia del gen de insulina I de rata (nucleótidos -356 a -7). La secuencia de estos oligonucleótidos cebadores es la siguiente:

InsI Directo 5'-ATACCAGGTCCCCAACAACACTGCAAC-3'

InsI Inverso 5'-TACTGGGTCTCCACTAGCTTTATAG-3'

Las condiciones de PCR fueron idénticas a las descritas para amplificar el gen de insulina endógeno en células MIN6.

3.9 ENSAYOS DE INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS *IN VITRO*

Para estudiar la interacción directa proteína-proteína se realizaron ensayos de “GST-pulldown”. La expresión de las proteínas recombinantes GST-Alx3, GST-Alx3₁₄₃₋₂₂₈ (Pérez-Villamil et al., 2004) o GST-E47 (Pérez-Moreno et al., 2001) en bacterias fue previamente inducida con IPTG, tras lo cual se purificaron con una matriz de glutation-sefarosa. Las proteínas E47 y Beta2, así como las distintas versiones truncadas de Alx3 se marcaron mediante ³⁵S-Metionina por traducción *in vitro* en un sistema de extractos de reticulocitos de conejo (Promega). La reacción de interacción se realizó a 4 °C durante 1 hora en una solución que contiene HEPES 20 mM (pH 7,9), KCl 150 mM, MgCl₂ 5mM, Tritón al 0.02 %, fluoruro de fenilsulfonilo (PMSF) 0.1 mM, albúmina de suero bobino (0.02 mg/ml) y cóctel de inhibidores de proteasas. Tras varios lavados las proteínas unidas a las partículas de sefarosa se desnaturalizaron y se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. La interacción entre las proteínas se detectó mediante autorradiografía. Para resolver el polipéptido Alx3₁₄₃₋₂₂₈ se utilizó un gel de poliacrilamida al 20%.

3.10 INMUNOPRECIPITACIÓN

Los ensayos de inmunoprecipitación se realizaron a partir de núcleos de células MIN6 (aproximadamente 2×10^7) obtenidos mediante la incubación de las mismas en una solución hipotónica (HEPES 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM) seguida de una vigorosa agitación en presencia de Igepal CA-360 al 0.06% (Sigma) (Schreiber et al., 1989). Los núcleos se lisaron en una solución que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Igepal CA-360 al 0.5 % y cóctel inhibidor de proteasas (Roche). Las proteínas nucleares se incubaron durante 16 horas a 4 °C con el antisuero anti-Alx3 o con el suero de conejo control. Transcurrido este tiempo se añadió proteína A-sefarosa y se incubó durante dos horas. Después de esto se centrifugaron las muestras, se lavaron y se resolvieron por electroforesis. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y la inmunorreactividad de E47/Pan1 se detectó por western immunoblot usando un anticuerpo monoclonal (BD Biosciences-Pharmingen, San Diego, CA) a una dilución 1:500.

3.11 EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN PANCREÁTICA IN VIVO

3.11.1 Animales

En estos experimentos se utilizaron ratones silvestres (*Alx3*^{+/+}) o deficientes en *Alx3* (*Alx3*^{-/-}) de la cepa C57BL/6. Los ratones carentes de *Alx3*, generados por recombinación homóloga, fueron proporcionados por el Dr. Frits Meijlink (Netherlands Institute for Developmental Biology, Utrecht, Holanda) (Beverdam et al., 2001). En estos animales parte del exon 2 así como los exones 3 y 4 de *Alx3* fueron sustituidos por una construcción que codifica el gen de resistencia a neomicina unido a lacZ.

Para el genotipado de los ratones utilizamos el kit comercial REDExtract-N-AmpTM Tissue PCR kit (Sigma).

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR fueron los siguientes:

Alx3Directo: 5' GAGGCTCAAGAACAAGGAAGGA 3'

Alx3Inverso: 5' CTAGGAGCAGGTCAGAGCAGGAAG 3'

lacZDirecto: 5' TCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAAT 3'

lacZInverso: 5' AGACCAACTGGTAATGGTAGCGAC 3'

Las condiciones de PCR para la amplificación de Alx3 fueron: 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 57 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 5 minutos. El tamaño del producto de PCR es de aproximadamente 300 pares de bases.

Las condiciones de PCR para la amplificación de lacZ fueron: 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y finalmente una incubación a 72 °C durante 5 minutos. El tamaño del producto de PCR es de aproximadamente 800 pares de bases.

3.11.2 Test de tolerancia a glucosa

Para llevar a cabo el test de tolerancia a glucosa se sometió a los animales a ayuno durante 16 horas. Pasadas las mismas se tomó una gota de sangre mediante punción de la vena safena para establecer niveles basales de glucemia, que se determinaron con ayuda de un glucómetro Glucotrend (Boehring). Tras esta determinación se administró intraperitonealmente suero glucosado hipertónico (2 mg de glucosa/g peso) para volver a determinar la concentración de glucosa en sangre 15, 60 y 120 minutos después de la inyección de glucosa.

3.11.3 Tratamiento con estreptozotocina

Se tomaron tanto animales carentes de Alx3 como animales control a los cuales se les inyectó una dosis diaria de estreptozotocina (40 mg/kg i.p) durante 5 días. Tomamos medidas de los niveles de glucosa en sangre antes, durante (antes de someterlos a la cuarta dosis) y después del tratamiento (en los días 2 y 9 posttratamiento).

La estreptozotocina se disolvió en una solución de citrato sódico 10 mM con 0.9% NaCl (pH 4.5) inmediatamente antes de su administración.

3.11.4 Determinación de la concentración de insulina en suero

Realizamos un estudio comparativo entre animales deficientes en Alx3 y animales silvestres. En ambos grupos los animales tenían una edad comprendida entre 16 y 20 semanas.

La determinación de la concentración de insulina se realizó utilizando un kit ELISA comercial (Cristal Chem.Inc) a través de una pequeña cantidad de suero (5µl) obtenida a partir de sangre extraída del plexo periorbital.

Los sueros se obtuvieron en tres momentos concretos, tras 16 horas de ayuno, 15 minutos tras la inyección de glucosa y dos horas después de dicha inyección.

La concentración de insulina se calculó a partir de los valores de absorbancia medidos a 492 nm. Estos valores se interpolaron en la curva, obtenida con los estándares de insulina, que representa la absorbancia frente a la concentración. La insulina es detectable en un rango de concentración de 156-10.000 pg/ml.

RESULTADOS

4.1 Expresión de Alx3 en líneas celulares productoras de insulina y somatostatina

La identificación inicial de Alx3 en células de insulinoma de hamster HIT-T15 (Rudnick et al., 1994) nos llevó a explorar su expresión en otros tipos de líneas celulares derivadas de páncreas endocrino y en los propios islotes de Langerhans. Inicialmente mediante western immunoblot comprobamos que Alx3 se expresa en extractos nucleares de células pancreáticas RIN-1027-B2 productoras de somatostatina y en células MIN6 productoras de insulina. Sin embargo, Alx3 no se expresa ni en fibroblastos BHK21, ni en células COS (Figura 7). Como control positivo confirmamos la presencia de Alx3 en células RC2.E10, una línea celular derivada de neuroepitelio de embrión de rata que expresa Alx3 y somatostatina constitutivamente (Schwartz and Vallejo 1998; Pérez-Villamil et al., 2004) (Figura 7).

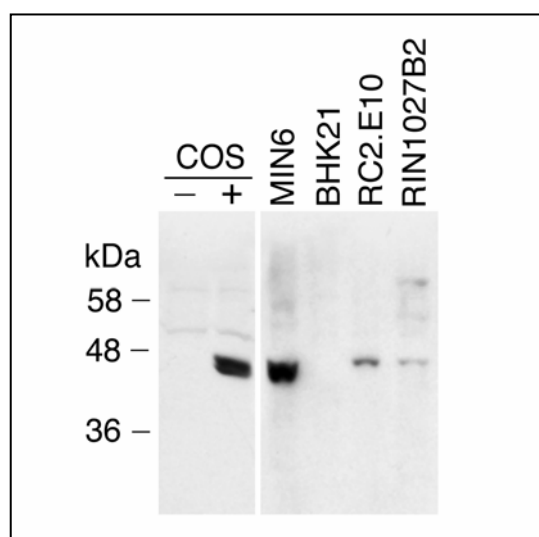


Figura 7: Expresión de Alx3 en distintas líneas celulares. Western inmunoblot que muestra la expresión de Alx3 en extractos nucleares de células COS transfectadas con pcDNA3-Alx3 (+), utilizadas como control positivo, así como en las líneas celulares RIN-1027-B2, MIN6 y RC2.E10. No se observa expresión ni en células COS sin transfectar (-) ni en BHK21.

Mediante técnicas inmunocitoquímicas confirmamos la localización nuclear de Alx3 en las líneas celulares MIN6 y RIN-1027-B2. (Figura 8 A-D).

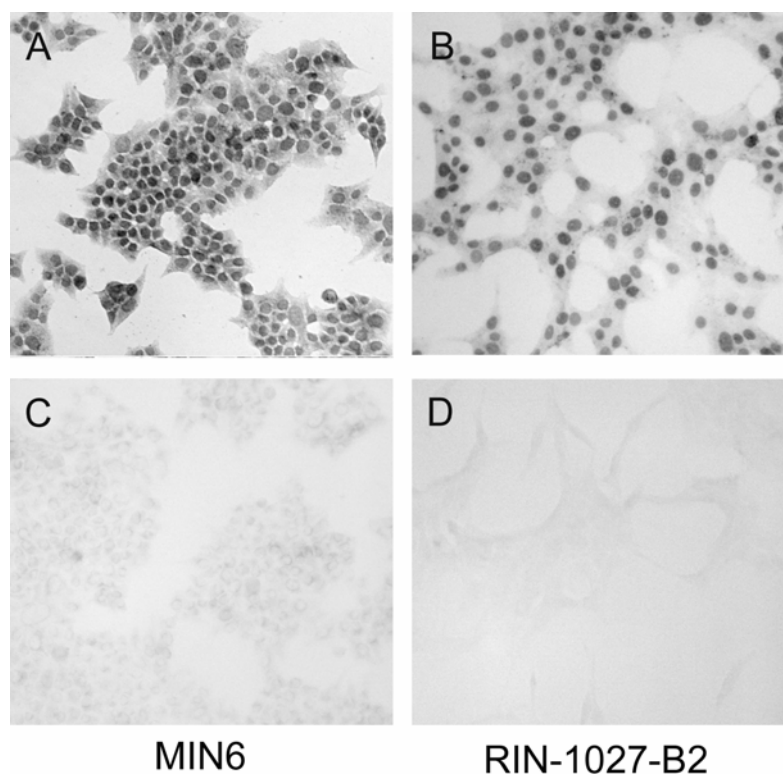


Figura 8: Expresión de Alx3 en líneas celulares pancreáticas. Inmunocitoquímica que muestra la presencia de inmunoreactividad de Alx3 en el núcleo de células MIN6 (A) y RIN-1027-B2 (B). En C) y D) se muestran los resultados de experimentos control realizados en paralelo en los que se omitió el suero anti-Alx3.

Tras comprobar la expresión nuclear de Alx3 en líneas celulares pancreáticas quisimos determinar si Alx3 se une a los promotores endógenos de insulina y somatostatina, para ello llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina sobre células MIN6 y RIN-1027-B2 respectivamente. Como se puede apreciar en la figura 9A, en los experimentos de inmunoprecipitación realizados sobre células MIN6 se amplificaron por PCR fragmentos de los promotores tanto del gen de insulina I como del gen de insulina II de ratón a partir de la cromatina inmunoprecipitada con el antisuero anti-Alx3, pero no así con el suero preinmune utilizado como control. Por el contrario no se obtuvo amplificación de un fragmento del promotor de PCK, que no se expresa en células β (Cissell et al., 2003) (Figura 9A), lo que indica que Alx3 expresado en las células MIN6 ocupa el promotor de insulina de forma específica.

Por otro lado la figura 9B muestra la amplificación por PCR de un fragmento del promotor de somatostatina a partir de la cromatina inmunoprecipitada de células RIN-1027-B2. Es decir, Alx3 se une tanto al promotor endógeno de insulina en células β como al de somatostatina en células δ .

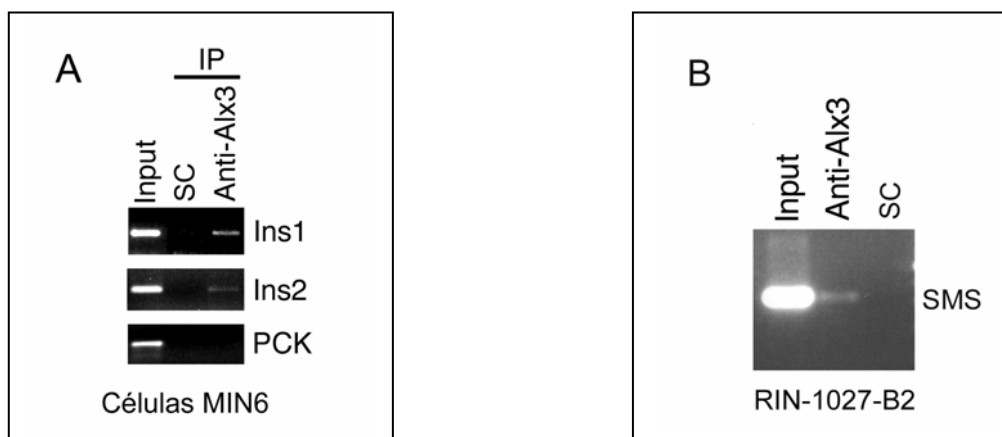


Figura 9: Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina que indican que Alx3 se une a los promotores de insulina y somatostatina. A) Amplificación de fragmentos de los promotores de los genes de insulina 1 y 2 a partir de muestras de cromatina de células MIN6 inmunoprecipitadas con un anticuerpo específico anti-Alx3, pero no a partir de muestras inmunoprecipitadas con un suero control (SC) inespecífico. Nótese la ausencia de amplificación de un fragmento del promotor de PCK utilizado como control. B) Amplificación de un fragmento del promotor del gen de somatostatina correspondiente a un experimento similar al anterior, pero realizado en células RIN-1027-B2.

Por último, para comprobar si Alx3 reconoce el gen de insulina *in vivo* llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina a partir de islotes pancreáticos aislados de ratón. La figura 10 muestra la amplificación selectiva por PCR de un fragmento del gen de insulina I a partir de la cromatina inmunoprecipitada con el antisuero anti-Alx3 y no así con el suero control.

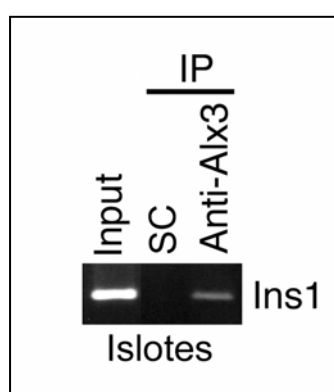


Figura 10: Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina que indican que Alx3 se une al promotor de insulina I *in vivo*. Se muestra la amplificación por PCR de la cromatina inmunoprecipitada (IP) a partir de islotes pancreáticos aislados de ratón con un anti-suero anti-Alx3 pero no con un suero control (SC) inespecífico.

4.2 Expresión de Alx3 en los islotes pancreáticos

Tras comprobar que Alx3 se expresa en líneas celulares pancreáticas quisimos determinar su expresión en páncreas de rata adulta. Para ello realizamos ensayos de inmunohistoquímica. Encontramos que la inmunotinción de Alx3 está restringida a los islotes, donde las células positivas a Alx3 se distribuyen a través de toda la masa del islote (Figura 11). El marcaje de doble antígeno demuestra que todas las células β , que sintetizan insulina, expresan Alx3 y que las células positivas para Alx3 situadas en la periferia de los islotes corresponden a células productoras de somatostatina y glucagón. (Figura 11). Es decir Alx3 se expresa tanto en células α , β y δ . Por el contrario el páncreas exocrino no presenta inmunorreactividad frente a Alx3.

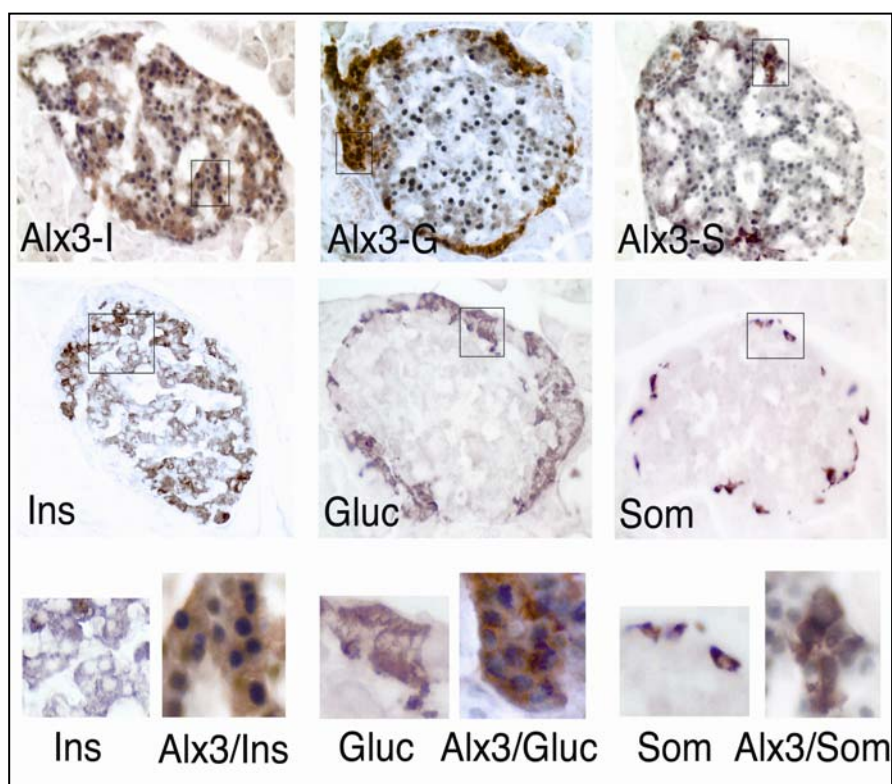


Figura 11: Detección inmunohistoquímica de Alx3, insulina, glucagón y somatostatina en islotes de rata. Los paneles superiores representan secciones en los que se realizó doble tinción para Alx3 e insulina (Alx3-I), Alx3 y glucagón (Alx3-G) o Alx3 y somatostatina (Alx3-S). Los paneles intermedios representan secciones teñidas sólo con insulina (Ins), glucagón (Gluc) o somatostatina (Som). Los paneles inferiores muestran a mayor aumento las regiones indicadas con un recuadro de los paneles superiores e intermedios. Nótese la ausencia de inmunoreactividad en las células del páncreas exocrino que rodea al islote.

Una vez determinada la expresión de Alx3 en páncreas de rata adulta nos preguntamos si éste sería un factor de transcripción de aparición temprana o tardía. Por ello estudiamos su expresión a lo largo del desarrollo embrionario realizando ensayos de inmunohistoquímica sobre embriones de rata de diferentes días de gestación. Como se aprecia en la figura 12, en el día 14 se detectan células débilmente positivas para Alx3, mientras en el día 16 se observa una inmunorreactividad clara e intensa en los grupos celulares que corresponden a los primordios de los islotes pancreáticos.

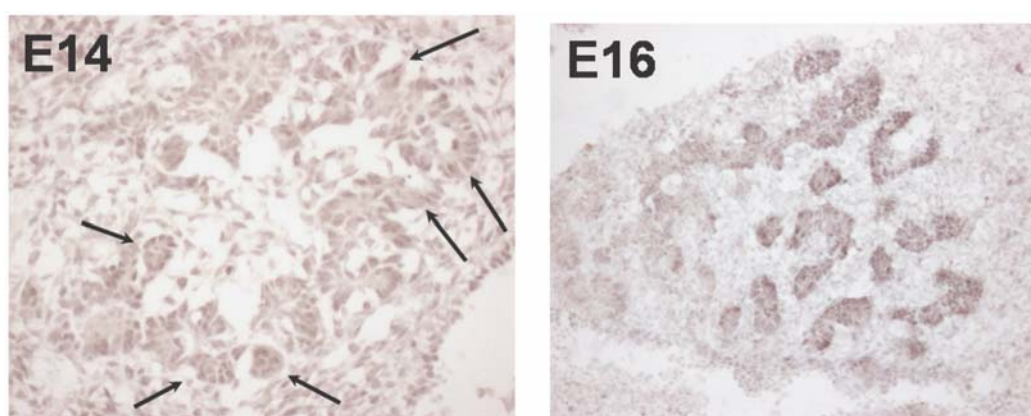


Figura 12: Expresión de Alx3 en páncreas embrionario. Localización inmunohistoquímica de células que expresan Alx3 en el páncreas de embriones de rata de 14 y 16 días de gestación.

4.3 Alx3 presente en células β reconoce el elemento A3/4 del promotor de insulina

La observación mediante inmunohistoquímica de que prácticamente todas las células β del islote expresan Alx3 nos permitió plantear la hipótesis según la cual Alx3 participa en la regulación de la expresión del gen de insulina. Esta hipótesis está además apoyada por los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en los que se demuestra que Alx3 se une al promotor de insulina. Habida cuenta de que el promotor del gen de insulina I es el más estudiado desde el punto de vista de la regulación transcripcional, decidimos ceñir nuestro trabajo sobre el mismo. La secuencia de los elementos A2 y A3/4 de este gen presentan motivos TAAT que podrían constituir potenciales dianas de unión de Alx3. Para determinar si Alx3 se une a alguno de estos elementos llevamos a

cabo ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA) con extractos nucleares de células MIN6.

Cuando utilizamos una sonda correspondiente al elemento A3/4 se pudieron observar diferentes complejos proteína-ADN, cuya especificidad de unión se determinó por competición con un oligonucleótido A3/4 sin marcar. En estas condiciones se observó la desaparición de los complejos en función de la concentración del oligonucleótido no marcado. Por el contrario la adición de un oligonucleótido de secuencia no relacionada no produjo ningún tipo de competición (Figura 13A).

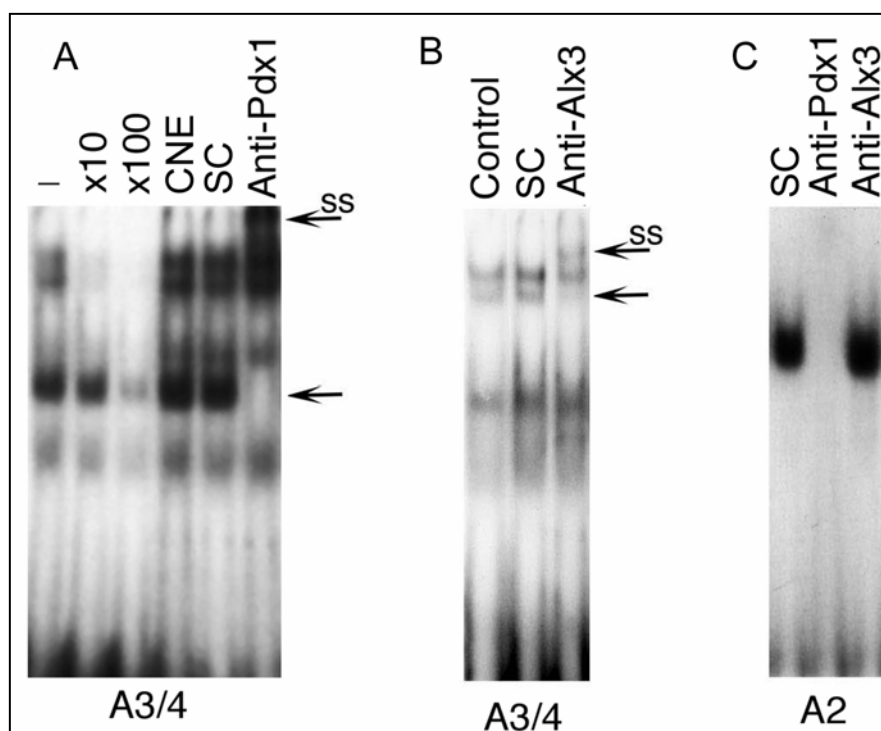


Figura 13: Unión de Alx3 al elemento A3/4. Ensayos de movilidad electroforética en los que se utilizaron las sondas correspondientes a las regiones A3/4 (A y B) y A2 (C). En (A), los extractos nucleares fueron incubados en ausencia (-) o presencia del mismo oligonucleótido sin marcar (en un exceso molar de 10- o 100-veces (10x, o 100x, respectivamente) o en presencia de un oligonucleótido competidor no específico (CNE) que fue añadido en un exceso molar de 100 veces y que no posee el motivo TAAT. Las flechas indican la banda retardada y las bandas que corresponden a los complejos que contienen Alx3 o Pdx1.

Para determinar si alguno de los complejos detectados que se unen al elemento A3/4 contiene Alx3 realizamos la reacción entre sonda y extracto nuclear en presencia

de suero anti-Alx3. La adición de este antisuero dió lugar a la desaparición de un complejo y a la aparición de una banda retardada que muestra la interacción de Alx3 con el elemento A3/4. Por el contrario la adición de suero preinmune no alteró ninguno de los complejos (Figura 13B). La especificidad del retardo, efecto observado tras añadir el antisuero anti-Alx3, se confirmó utilizando el antisuero α 253 el cual reconoce específicamente el factor de transcripción Pdx1, que regula el gen de insulina a través de su unión al elemento A3/4 (Ohneda et al., 2000b) (Figura. 13A). Como era de esperar el anticuerpo anti-Pdx1 afecta a un complejo distinto al afectado por el anticuerpo anti-Alx3 (Figura 10A).

Cuando utilizamos como sonda un oligonucleótido correspondiente al elemento A2 solamente pudimos identificar un complejo proteína-ADN. Comprobamos que este complejo contiene Pdx1 pero no Alx3, ya que dicho complejo desaparece específicamente en presencia del antisuero anti-Pdx1 pero no de anti-Alx3 (Figura 13C). Es decir estos datos demuestran que Alx3, presente en las células β MIN6, es capaz de reconocer específicamente el elemento A3/4 del promotor de insulina.

4.4 Alx3 induce la activación del promotor de insulina

Para investigar si Alx3 posee la capacidad de transactivar el promotor de insulina, cotransfectamos la línea celular MIN6 con el plásmido testigo INSCAT que contiene un fragmento del promotor de insulina (Figura 14). Observamos que la actividad INSCAT en células MIN6 transfectadas es relativamente alta, con valores similares a los encontrados tras transfectar el plásmido control RSVCAT, como era de esperar en una línea celular que expresa insulina constitutivamente. Encontramos que la cotransfección de INSCAT con pcDNA3-Alx3 no produce incremento alguno en la actividad del promotor (Figura 14). Del mismo modo, Pdx1, conocido transactivador del gen de insulina (Ohneda et al., 2000b), tampoco produjo aumento en la actividad del promotor.

Este resultado no sorprende, pues se sabe que Pdx1 no induce actividad en el promotor de insulina a menos que se encuentre en combinación sinérgica con las proteínas E47/Pan1 y Beta2 (Peers et al., 1994; Ohneda et al., 2000b). Por ello investigamos si Alx3 es capaz de transactivar el promotor de insulina en presencia de

las mismas. La cotransfección de INSCAT con vectores de expresión para E47/Pan1 y Beta2, cada uno por separado o en combinación no produjo ningún incremento de la actividad CAT en células MIN6. Sin embargo, la actividad generada por INSCAT aumentó en 2-3 veces cuando combinamos el vector de expresión para Alx3 con los plásmidos de expresión para E47/Pan1 y Beta2 (Figura 14), lo que confirma que es necesaria la interacción con estas proteínas bHLH.

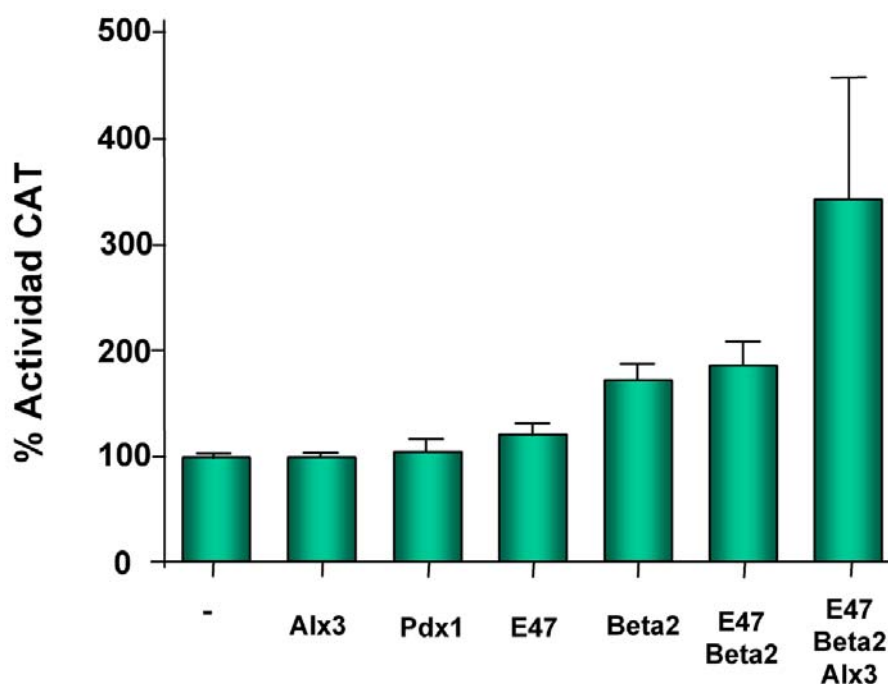


Figura 14: Alx3 induce la activación del promotor de insulina en células MIN6. Niveles de actividad CAT observados en células MIN6 cotransfectadas con el plásmido testigo INSCAT y los vectores de expresión para los factores de transcripción indicados.

Sin embargo puede observarse la magnitud de la respuesta obtenida es relativamente pobre en esta línea celular. Cabe interpretar este resultado como el reflejo de la existencia de niveles saturantes de Alx3 endógeno y otros factores de transcripción característicos de células β que regulan la expresión del gen de insulina, tales como Pdx1 y Beta2. Además, la posible existencia de cantidades limitantes de coactivadores transcripcionales como CBP/p300, el cual interacciona con estos factores de transcripción para regular el gen de insulina (Qiu et al., 2002), puede explicar la reducida actividad del promotor INSCAT. Para evaluar esta hipótesis cotransfectamos el plásmido testigo con un vector de expresión que codifica CBP/p300 (Ramirez et al.,

1997) Cuando cotransfectamos CBP/p300 sólo observamos cómo la actividad generada por INSCAT aumenta en función de la concentración, lo que sugiere que este coactivador se encuentra en cantidades limitantes en las células MIN6. Por otro lado observamos que aunque Alx3 no tiene ningún efecto por sí mismo, es capaz de estimular la actividad INSCAT en presencia de CBP/p300 aproximadamente 2 veces por encima de la producida por CBP/p300 solo, y unas 5-6 por encima de la actividad basal de INSCAT (Figura 15).

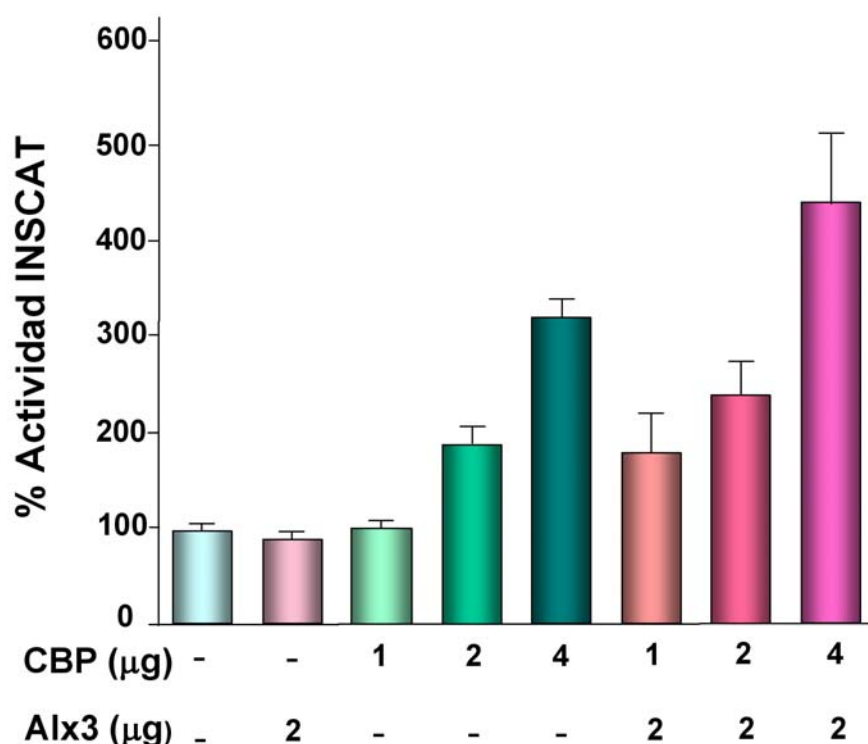


Figura 15: Interacción funcional entre Alx3 y CBP/p300. Niveles de actividad CAT observados en células MIN6 cotransfectados con el plásmido testigo INSCAT y vectores de expresión para Alx3 y CBP/p300. Los números situados debajo de cada columna representan la cantidad en μg de los vectores de expresión utilizados.

Todos estos datos sugieren la existencia de interferencias producidas por la existencia de niveles relativamente elevados de estos factores de transcripción. Para minimizar tales interferencias utilizamos células HeLa en los siguientes experimentos, ya que ésta línea celular no expresa factores de transcripción específicos de célula β ni

contiene niveles detectables de Alx3, como comprobamos mediante Western immunoblot (Figura 16).

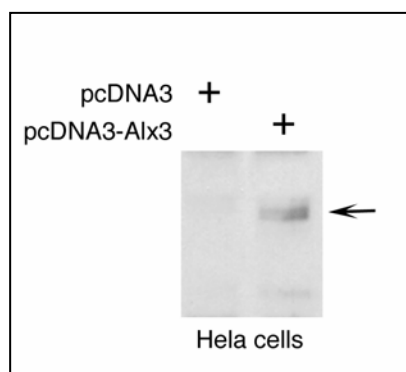


Figura 16: Alx3 no se expresa en células Hela. Western inmunoblot que muestra la presencia de Alx3 en extractos nucleares de células Hela sólo cuando las mismas han sido transfectadas con el vector de expresión pcDNA3-Alx3 y no así cuando fueron transfectadas con el vector vacío pcDNA3.

La cotransfección de células Hela con INSCAT no produjo ningún incremento en la actividad CAT pues como puede observarse en la figura 16 el porcentaje con respecto al plásmido testigo de referencia CMVCAT es muy bajo. Del mismo modo, la cotransfección con Alx3, Pdx1 o E47/Pan1 tampoco produjo ningún aumento de la actividad CAT. Por el contrario, la combinación de Alx3 y E47/Pan1 muestra una clara inducción del promotor de insulina. Este incremento es muy similar al que se observa cuando cotransfectamos Pdx1 y E47/Pan1 (Figura 17).

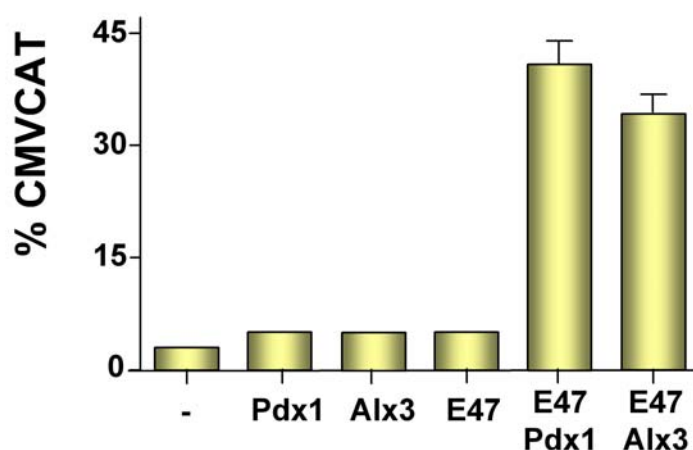


Figura 17: Alx3 induce la activación del promotor de insulina en células Hela. Niveles de actividad CAT observados en células Hela cotransfectadas con el plásmido testigo INSCAT y los plásmidos de expresión que codifican los factores de transcripción indicados.

Estos resultados coinciden con estudios previos que indican que proteínas homeodominio y bHLH cooperan para regular la expresión del gen de insulina (Peers et al., 1994; Glick et al., 2000; Ohneda et al., 2000b), y sugieren la existencia de interacciones funcionales entre Alx3 y E47/Pan1.

Se ha descrito previamente que las interacciones sinérgicas entre proteínas bHLH y homeodominios ocurren a nivel del elemento E2A3/4 (Ohneda et al., 2000b). Por ello comprobamos la actividad transcripcional de Alx3 sólo o en combinación con E47/Pan1 o Beta2 sobre este elemento promotor. Con este propósito llevamos a cabo transfecciones de células Hela usando el plásmido testigo 5FFCAT (Thomas et al., 1999). Estos experimentos muestran que la actividad de este plásmido testigo en células Hela no aumenta cuando se transfecta solo Alx3 o E47/Pan1. Por su parte Beta2 por sí mismo produjo un ligero incremento en la actividad CAT que a su vez se ve potenciado en presencia de E47/Pan1 (Figura 18). Por el contrario observamos que aunque carece de actividad transcripcional por sí mismo, Alx3 es capaz de inducir la transcripción de 5FFCAT en presencia de E47/Pan1 o Beta2, un efecto que además se incrementa significativamente cuando ambos están presentes simultáneamente junto a Alx3 (Figura 18).

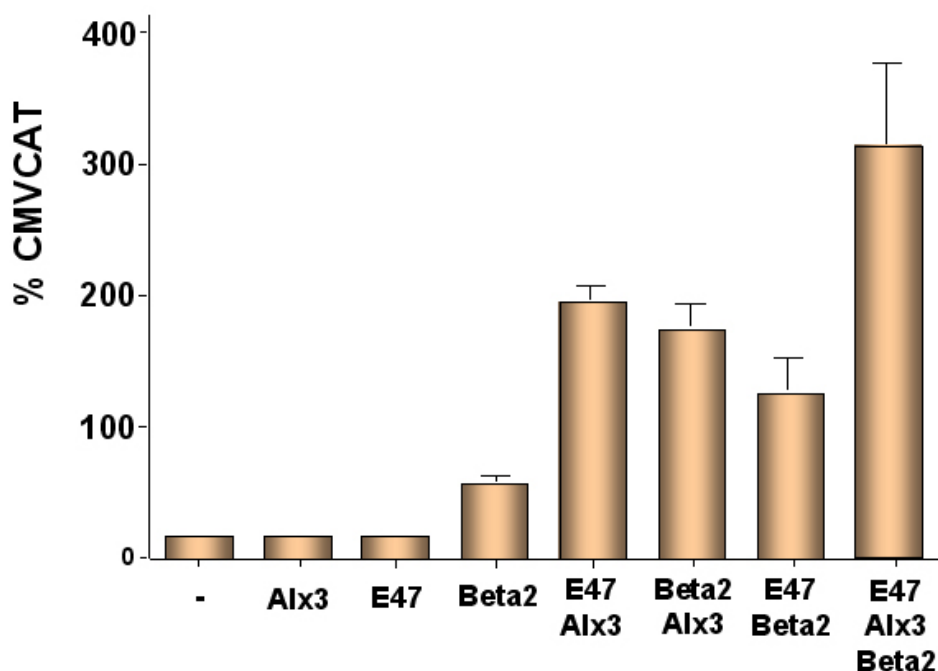


Figura 18: Alx3 actúa sobre elemento E2A3/4. Niveles de actividad CAT observados en células Hela cotransfectadas con el plásmido testigo 5FFCAT y los plásmidos de expresión que codifican los factores de transcripción indicados.

Estos experimentos demuestran que Alx3 y las proteínas bHLH actúan sinérgicamente para transactivar el gen de insulina en células β . Estos resultados, junto a los EMSAs descritos anteriormente, indican que Alx3 dirige la transcripción del gen de insulina mediante su unión al elemento E2A3/4.

4.5 Alx3 interacciona con E47/Pan1 pero no con Beta2

El efecto sinérgico observado en los ensayos de transfección transitoria nos llevó a investigar la existencia de interacciones directas proteína-proteína entre Alx3 y E47/Pan1 y/o Beta2. Usando ensayos de GST-pulldown encontramos que la proteína de fusión GST-Alx3 es capaz de interactuar con E47/Pan1 pero no con Beta2 (Figura 19). Dado que es conocida la interacción directa entre E47/Pan1 y Beta2 para formar un heterodímero, usamos GST-E47 como control positivo para confirmar esta interacción (Figura 19).

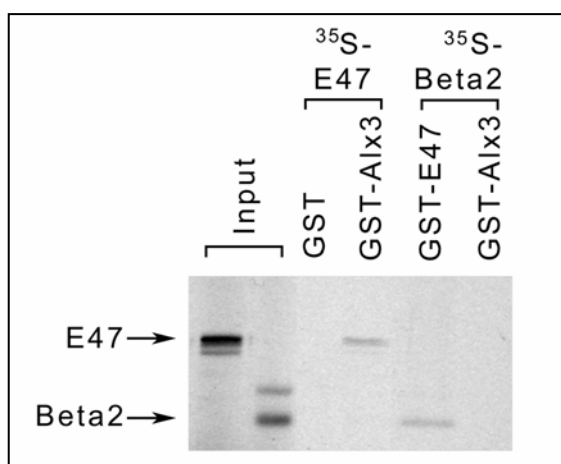


Figura 19: Alx3 interacciona con E47/Pan1 pero no con Beta2. Ensayo GST-pulldown realizados con proteínas E47/Pan1 y Beta2 traducidas y marcadas con S^{35} *in vitro*, y con las proteínas de fusión que se indican. Nótese que E47/Pan1 interacciona con GST-Alx3, pero no con el control GST, mientras Beta2 interacciona con GST-E47 pero no con GST-Alx3.

Estos datos indican que Beta2 es incapaz de interaccionar con Alx3. Sin embargo, nuestros experimentos de transfección en células Hela indican la existencia de un incremento sinérgico en la actividad CAT cuando los vectores de expresión para Beta2, E47/Pan1 y Alx3 son cotransfectados junto con el plásmido testigo 5FFCAT (ver Figura 18). Es decir, es posible que la interacción funcional entre Beta2 y Alx3 sea mediada por E47/Pan1 actuando como una proteína puente, que interaccionaría directamente tanto con Beta2 por un lado, como con Alx3 por otro. Para evaluar esta hipótesis llevamos a cabo experimentos de GST-pulldown usando la proteína de fusión GST-Alx3 y Beta2 marcada con ^{35}S , en presencia o en ausencia de E47/Pan1 sintetizada *in vitro* mediante un sistema de lisado de reticulocitos. Como se observa en la figura 20, sólo se detecta la banda correspondiente a Beta2 cuando E47/Pan1 está presente en la reacción de unión, lo que indica la formación de un complejo trimérico y confirma que Beta2 interacciona indirectamente con Alx3 por medio del contacto directo con E47/Pan1.

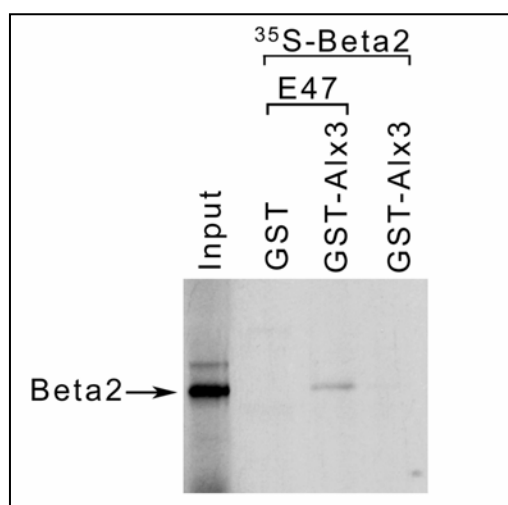


Figura 20: Interacción indirecta entre Alx3 y Beta2 a través de E47/Pan1. Ensayo GST-pulldown realizados con la proteína E47/Pan1 traducida en frío y Beta2 traducida y marcada con S^{35} *in vitro*, y con las proteínas de fusión que se indican. Nótese que la banda correspondiente a Beta2 se detecta solamente cuando E47/Pan1 sin marcar está presente en la mezcla de reacción.

Para determinar si Alx3 y E47/Pan1 interaccionan directamente *in vivo* realizamos ensayos de inmunoprecipitación de proteína a partir de extractos nucleares de células MIN6. Para ello usamos el antisuero anti Alx3, seguido de la

detección de E47/Pan1 por western immunoblot con un anticuerpo monoclonal específico anti-E47. Como muestra la figura 21 se puede detectar una banda correspondiente a E47/Pan1 en las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-Alx3 pero no en las muestras inmunoprecipitadas con un suero control, confirmando que Alx3 y E47/Pan1 interaccionan en el núcleo de las células.

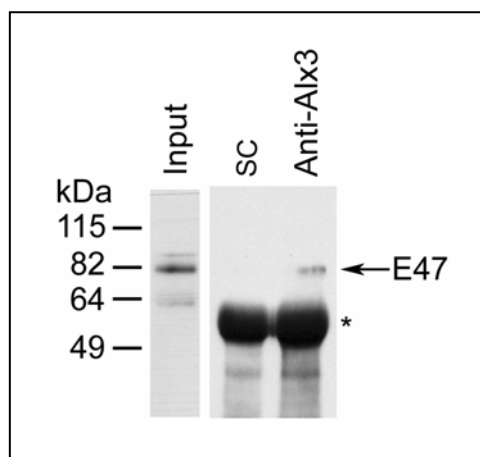


Figura 21: Interacción entre Alx3 y E47/Pan1 *in vivo*. Se muestra un western immunoblot llevado a cabo con el anticuerpo anti-E47 sobre muestras inmunoprecipitadas con el antisuero anti-Alx3 o con suero control de conejo (SC) inespecífico a partir de lisados nucleares de células MIN6. El asterisco denota la presencia de inmunoglobulinas en las muestras inmunoprecipitadas.

Alx3 contiene tres dominios ricos en prolina (Pérez-Villamil et al., 2004), dos de ellos (Pro1 y Pro2) localizados en la región amino-terminal, y un tercero (Pro3), separado de los dos anteriores por el homeodominio, localizado en el extremo carboxilo-terminal (Figura 22A). Para determinar si estos dominios son importantes en la interacción con E47/Pan1, llevamos a cabo ensayos de GST-pulldown usando Alx3 o versiones truncadas del mismo, generada mediante deleciones de residuos situados en los extremos carboxilo- y/o amino- terminal. Como muestra la figura 22B la deleción de los dominios ricos en prolina no afecta la interacción de Alx3 con GST-E47/pan1, lo cual sugiere que ésta se lleva a cabo a través de la región correspondiente al homeodominio de Alx3.

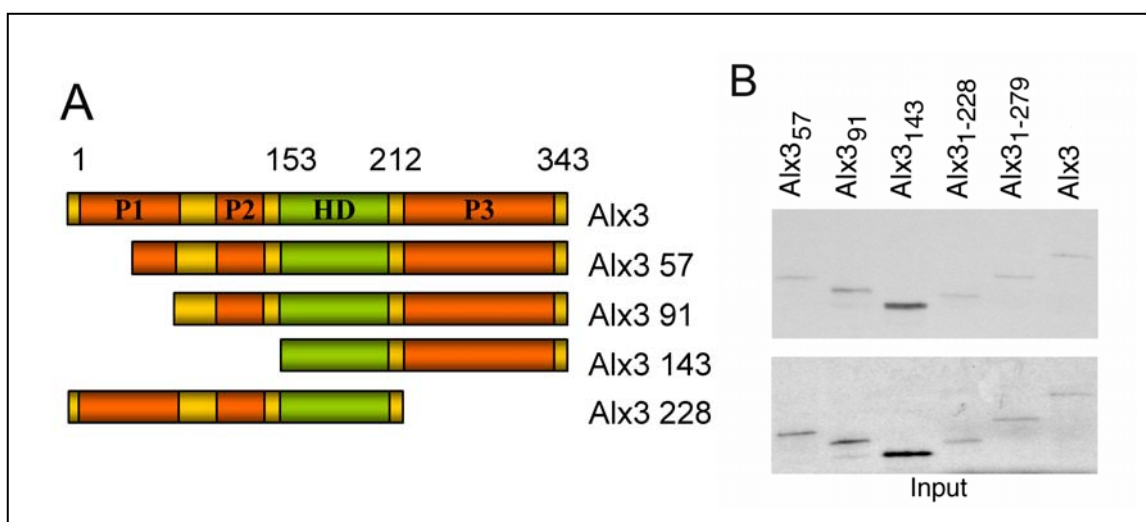


Figura 22: Los dominios ricos en prolina de Alx3 no participan en su interacción con E47/Pan1. A) Representación esquemática de las versiones truncadas de Alx3 usadas en los experimentos de GST-pulldown. Los dominios ricos en prolina (P1, P2 y P3) están indicados como cajas naranjas, y el homeodominio (HD) en verde. B) Ensayo de GST-pulldown en el que la proteína purificada GST-E47 fue incubada con versiones truncadas de Alx3 traducidas y marcadas con S³⁵ *in vitro*.

Este aspecto fue confirmado tras observar que GST-E47/Pan1 también interacciona con Alx3₁₄₃₋₂₂₈, fragmento que contiene sólo la región correspondiente al homeodominio (Figura 23). Estos experimentos indican que el homeodominio de Alx3 es suficiente para que la heterodimerización con E47/Pan1 se pueda llevar a cabo.

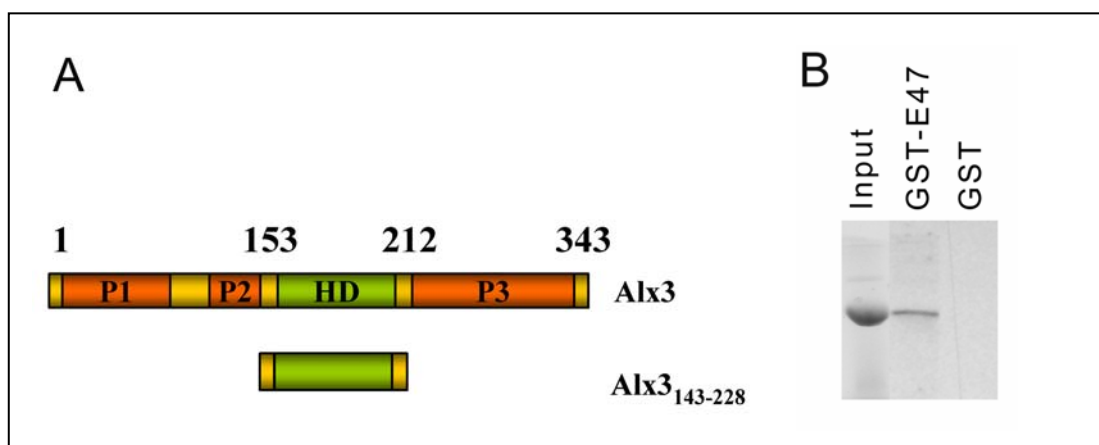


Figura 23: Alx3 interacciona con E47/Pan1 a través de su homeodominio. A) Representación esquemática de la región de Alx3 que corresponde al homeodominio (Alx3₁₄₃₋₂₂₈) utilizada en este ensayo, en relación a la proteína completa. B). Ensayo de GST-pulldown en el que la proteína purificada GST-E47 fue incubada con la versión truncada de Alx3 correspondiente al homeodominio traducidas y marcadas con S³⁵ *in vitro*.

4.6 El homeodominio de Alx3 promueve la unión de E47/Pan1 al elemento E2A3/4

Para evaluar la unión directa de Alx3 y E47/Pan1 al promotor de insulina, llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y EMSAs. Previamente hemos determinado que ni las deleciones del extremo amino-terminal ni las del carboxilo-terminal, las cuales mantienen intacto el homeodominio, afectan a la unión al ADN (Pérez-Villamil et al., 2004). Por ello para resolver mejor los complejos de unión proteína-ADN utilizamos las versiones Alx3₁₄₃ y Alx3₁₄₃₋₂₂₈.

Está descrito que la unión de las homeoproteínas del tipo *aristaleless*, al que pertenece Alx3, forman dímeros cooperativamente sobre secuencias consenso del ADN conocidas como P3, las cuales contienen dos sitios TAAT invertidos y separados por tres nucleótidos (Qu et al., 1997; Tucker and Wisdom, 1999; Pérez-Villamil et al., 2004). El elemento A3/4 del promotor de insulina contiene la secuencia TAATCTAATTA, la cual guarda una similitud considerable con los elementos P3. Esto nos llevó a determinar si Alx3 es capaz de unirse al elemento A3/4 del mismo modo que lo hace a estos sitios.

En ensayos EMSA encontramos que Alx3₁₄₃ se une a la sonda E2A3/4 formando dos complejos (Figura 24), es decir de forma similar al modelo de unión por dimerización cooperativa observado sobre los sitios P3 (Pérez-Villamil et al., 2004). La dimerización de Alx3 sobre el elemento E2A3/4 se confirma cuando comparamos su unión sobre este elemento con la observada a la sonda GFAPT3 (Pérez-Villamil et al., 2004), a la que se une como monómero (Figura 24).

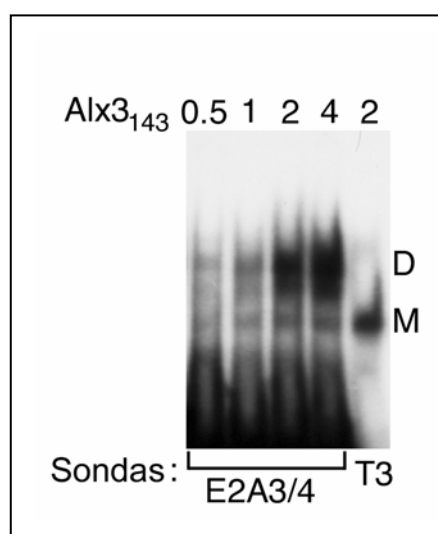


Figura 24: Unión de Alx3 a la sonda correspondiente al elemento E2A3/4 del gen de insulina I de rata. Ensayo de movilidad electroforética realizado con Alx3₁₄₃ sintetizado en lisado de reticulocitos. La cantidad de lisado (μl) se indica en la parte superior, y las sondas utilizadas en la parte inferior. GFAPT3 (T3) se utilizó como control de unión monomérica (M). Nótese que Alx3 se une a E2A3/4 en forma dimérica (D).

Trabajos previos realizados con proteínas recombinantes (Peers et al., 1994; Naya et al., 1995; Ohneda et al., 2000b) han mostrado que E47/Pan1, pero no Beta2, se puede unir a la sonda E2A3/4 pero nosotros observamos que la unión de E47/Pan1 a E2A3/4 es débil. Para determinar la cantidad mínima de E47/Pan1 necesaria para que se detecte su unión a la sonda E2A3/4, llevamos a cabo ensayos de titulación e investigamos si E47/Pan1 podía unirse cooperativamente con Alx3 a este sitio. Para los estudios descritos a continuación E47/Pan1 se usó a una concentración a la que no era apreciable su unión a la sonda E2A3/4.

Cuando incubamos E47/Pan1 simultáneamente con Alx3₁₄₃, no se observa ninguna alteración de los complejos correspondientes a la forma monomérica y dimerica de Alx3, pero aparece una banda de menor movilidad electroforética, un efecto que no observamos cuando utilizamos a Beta2 en lugar de E47/Pan1 (Figura 25A). Cuando utilizamos la delección Alx3₁₄₃₋₂₂₈, que solamente contiene la región correspondiente al homeodominio de Alx3, encontramos un efecto similar (Figura 25B).

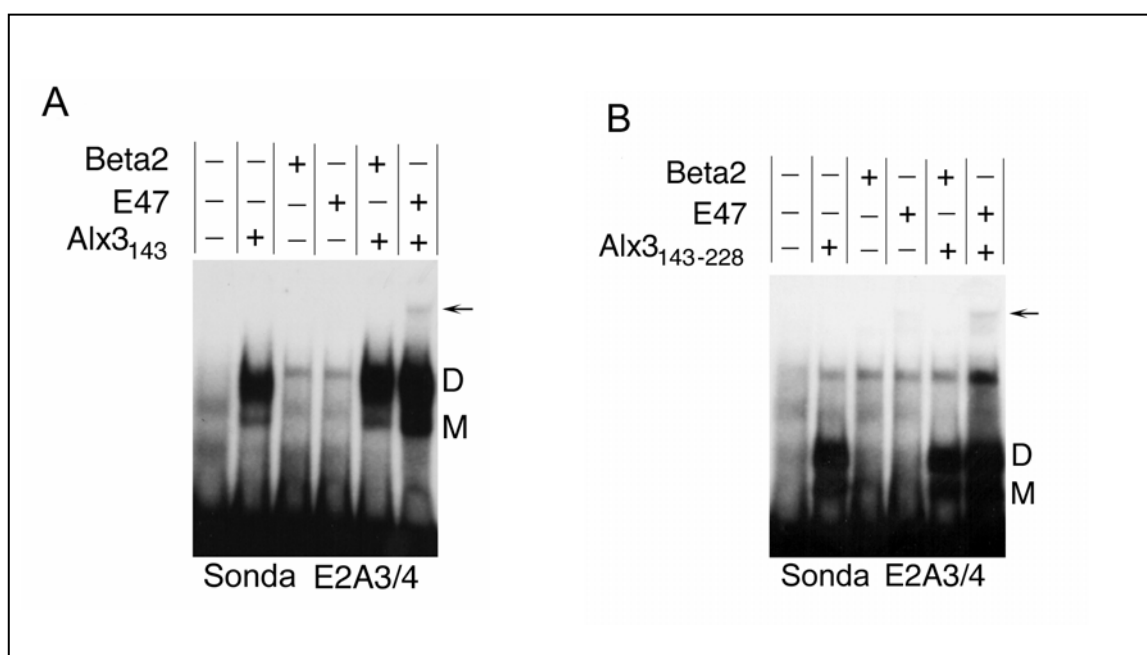


Figura 25: Alx3 promueve la unión cooperativa de E47/Pan1 al elemento E2A3/4. Ensayo de movilidad electroforética que muestra la unión de Alx3₁₄₃ (A) o Alx3₁₄₃₋₂₂₈ (B) a la sonda E2A3/4, en condiciones en las que E47/Pan1 no se une por sí solo. La flecha indica la formación de un complejo que contiene E47/Pan1 sólo en presencia de Alx3.

Estos resultados indican que Alx3 y E47/Pan1 pueden interaccionar cooperativamente formando un complejo ternario sobre el ADN, y que el homeodominio de Alx3 es suficiente para que ocurra dicha interacción. Por tanto, cabe proponer que esta interacción tiene lugar sobre el elemento A3/4 independientemente de la unión de E47 al elemento E2. Para testar esta hipótesis realizamos nuevos EMSAs utilizando como sonda un oligonucleótido que carece del sitio de unión a E2 (Figura 26). Observamos que la incubación de Alx3₁₄₃₋₂₂₈ y E47/Pan1 también da lugar a la aparición de una banda adicional que no se observa cuando Alx3₁₄₃₋₂₂₈ se utiliza sólo o bien en combinación con Beta2 (Figura 26).

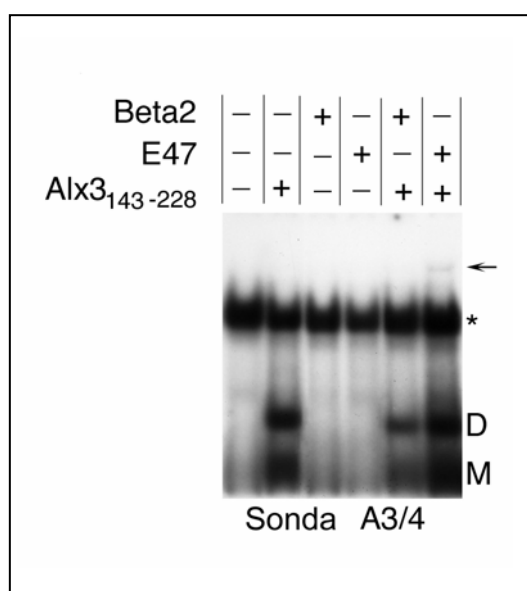


Figura 26: Unión de Alx3 y E47/Pan1 al elemento A3/4 que carece del sitio de unión E2. Ensayo de movilidad electroforética que muestra la unión de Alx3₁₄₃₋₂₂₈ a la sonda A3/4, en condiciones en las que E47/Pan1 no se une por sí solo. Las flechas indican el complejo que contiene E47/Pan1. El asterisco indica la unión no específica del lisado de reticulocitos.

Es decir, estos experimentos confirman nuestros resultados previos obtenidos en los experimentos GST-pulldown e indican que el homeodominio de Alx3 unido a ADN es capaz de interaccionar con E47/Pan1 incluso en ausencia de la caja E2, de manera que E47/Pan1 no establece contacto directo con el ADN.

Estos experimentos sugieren que Alx3 unido al ADN podría reclutar a E47/Pan1 para unirse al promotor de insulina. Para evaluar esta hipótesis llevamos a cabo ensayos

de inmunoprecipitación de cromatina en células HeLa cotransfectadas con el plásmido testigo INSCAT, el cual contiene el elemento E2A3/4, y con los vectores de expresión para E47/Pan1, Alx3 o bien el vector vacío pcDNA3. La figura 27 muestra cómo la ocupación del promotor de insulina por E47/Pan1 sólo es detectable cuando Alx3 está presente.

Estos datos de inmunoprecipitación confirman que la interacción entre Alx3 y E47/Pan1 ocurre tanto *in vitro* con proteínas recombinantes como *in vivo* en el interior de la célula.

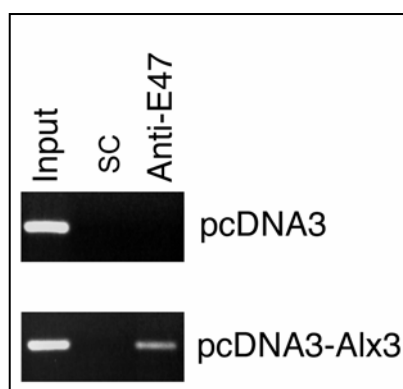


Figura 27: Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina que muestra que Alx3 facilita la unión de E47/Pan1 al promotor de insulina. Se muestra la amplificación por PCR de un fragmento del gen de insulina I de rata a partir de cromatina inmunoprecipitada de células HeLa cotransfectadas con el plásmido testigo INSCAT y el vector de expresión pcDNA3-E47, así como con el vector de expresión pcDNA3-Alx3 o bien con el plásmido control pcDNA3. Las inmunoprecipitaciones fueron llevadas a cabo usando el suero específico anti-E47 o el control anti-IgG.

4.7. El homeodominio de Alx3 es suficiente para promover la transactivación dependiente de E47/Pan1

Una vez comprobada la actividad transcripcional de Alx3 sobre el promotor de insulina quisimos evaluar las contribuciones de cada uno de los dominios Pro1, Pro2 y Pro3 a la misma. Con este propósito cotransfectamos las células HeLa con el plásmido testigo 5FFCAT y vectores de expresión que codifican Alx3 o versiones truncadas del mismo que carecen de los dominios amino o carboxilo-terminal (Figura 28A). Como Alx3 es incapaz de transactivar 5FFCAT a menos que E47/Pan1 esté presente (ver Figura 18) en las transfecciones se añadió pcDNA3-E47. En estos experimentos

encontramos que cuando no están presentes los residuos 1-143 de Alx3 (Alx3₁₄₃) (Figura 28B), eliminando así por entero la región amino-terminal hasta alcanzar una región próxima al homeodominio, la actividad CAT producida por ambas proteínas se reduce menos de un 50% del obtenido con la proteína Alx3 completa, indicando que los dominios Pro1 y Pro2 de Alx3 no son imprescindibles para la transactivación del gen de insulina en presencia de E47/Pan1. Para probar si el dominio Pro3 localizado en la región carboxilo-terminal de Alx3 es esencial para la transactivación, cotransfectamos un vector de expresión que codifica la versión truncada de Alx3, Alx3₁₋₂₂₈, en la cual los dominios Pro1 y Pro2, así como el homeodominio se mantienen intactos. Encontramos que Alx3₁₋₂₂₈ produjo unos niveles de actividad CAT que resultaron ser cerca del 80% a los obtenidos con la proteína Alx3 completa en presencia de E47/Pan1, indicando que el dominio Pro3 no es esencial para la actividad cuando los otros dos dominios permanecen intactos. Finalmente, cotransfectamos un vector de expresión que codifica Alx3₁₄₃₋₂₂₈, una proteína truncada de Alx3 en la cual tanto la región amino- como la carboxilo-terminal habían sido delecionada manteniendo intacto el homeodominio. Encontramos que la actividad producida por Alx3₁₄₃₋₂₂₈ es cerca del 20% de la producida por la versión completa de Alx3 (Figura 28B).

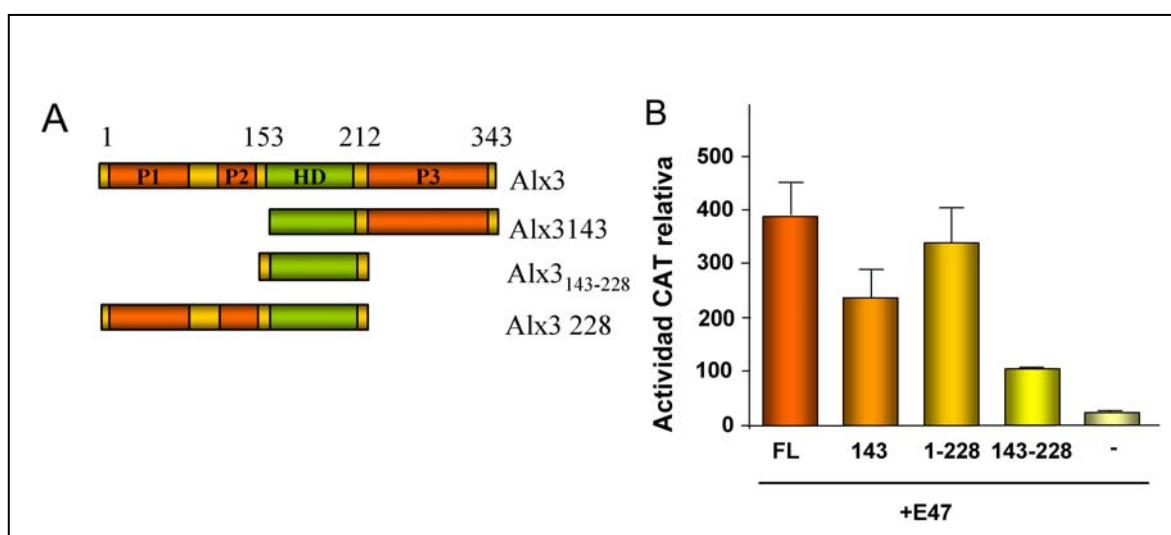


Figura 28: Contribución de los dominios de prolina a la actividad transcripcional de Alx3 sobre el promotor de insulina. A) Esquema de la deleciones de Alx3 utilizadas en los experimentos de cotransfección B) Niveles de actividad CAT observados en células Hela cotransfectadas con el plásmido testigo 5FFCAT, el vector de expresión que codifica E47/Pan1 y los plásmidos que codifican a las diferentes versiones truncadas de Alx3. Nótese que aún se detecta actividad transcripcional en ausencia de todos los dominios ricos en prolina.

Sorprendentemente, aunque se reduce de forma considerable, es todavía significativo el grado de actividad del homeodominio al compararlo con los niveles basales de la actividad 5FFCAT, la cual no se incrementa cuando E47/Pan1 o Alx3 son transfectados solos (Figura 18). Habida cuenta que nuestros trabajos previos demostraron que el homeodominio de Alx3 carece de actividad transcripcional por sí solo (Pérez-Villamil et al., 2004), estos experimentos sugieren que la actividad residual observada cuando se transfectan Alx3₁₄₃₋₂₂₈ y E47/Pan1 es debida a la actividad de E47/Pan1 reclutado por el homeodominio de Alx3 al promotor de insulina.

Para evaluar esta hipótesis, cotransfectamos el plásmido testigo 5FFCAT con vectores de expresión que codifican versiones truncadas de E47/Pan1 correspondientes a deleciones amino-terminal hasta los residuos 91, 334 o 549, que carecen de uno o dos de los dominios de activación pero que mantienen intacto el dominio bHLH (Figura 29A). La cotransfección de estos plásmidos con el vector de expresión de Alx3₁₄₃₋₂₂₈ dió lugar a niveles basales de actividad CAT indistinguibles de los observados cuando Alx3₁₄₃₋₂₂₈ se transfectó solo, significativamente menores que los obtenidos cuando se utilizó E47/Pan1 completo (Figura 29B). Es decir, la estimulación de la actividad de 5FFCAT en presencia del homeodominio de Alx3 es dependiente de la integridad de los dominios de transactivación de E47/Pan1.

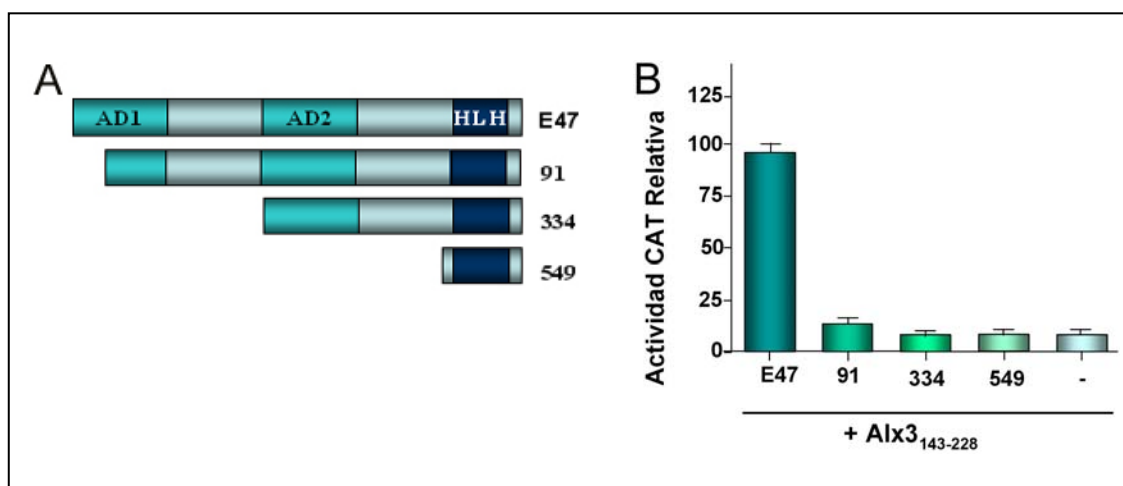


Figura 29: Actividad transcripcional de E47/Pan1 en presencia del homeodominio de Alx3. **A)** Esquema de la deleciones de E47 utilizadas. AD1 y AD2, dominios de activación 1 y 2; HLH dominio hélice-loop-hélice. **B)** Actividad CAT observada en células Hela cotransfectadas con el plásmido testigo 5FFCAT, un vector de expresión para la versión truncada de Alx3 que codifica al homeodominio (Alx3₁₄₃₋₂₂₈) y vectores de expresión que codifican a la forma completa de E47/Pan1 y sus deleciones.

En resumen, todos estos experimentos apoyan la idea según la cual el homeodominio de Alx3 interacciona con E47/Pan1 sobre el promotor de insulina. Por tanto, la transactivación transcripcional dependiente del elemento E2A3/4 se debe a la actividad coordinada de los dominios ricos en prolina de Alx3, de los dominios de transactivación de E47/Pan1, y de Beta2 formando complejo con E47/Pan1.

4.8 Participación de Alx3 en los mecanismos de control de la glucemia

Para investigar el posible papel de Alx3 en la regulación de la función pancreática de las células β , determinamos inicialmente los niveles de glucosa en sangre en ratones carentes de Alx3 (Beverdam et al., 2001), a los que distribuimos en dos grupos experimentales según su edad. Por un lado, ratones con una edad comprendida entre 14-20 semanas, a los que denominamos animales jóvenes, y por otro, ratones entre 34-40 semanas, denominados maduros. La figura 30 muestra cómo la concentración de glucosa en sangre en los animales jóvenes está ligeramente elevada con respecto a la de los animales control. Esta diferencia aumenta considerablemente en animales maduros, lo cual sugiere la existencia de un deterioro pancreático progresivo en función de la edad.

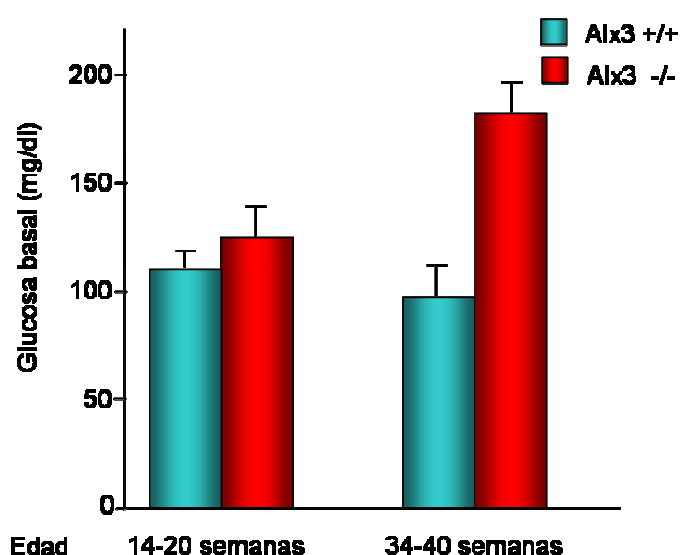


Figura 30: Elevación de los niveles basales de glucosa en sangre de ratones carentes de Alx3. Se representa la glucemia tras ayuno en animales repartidos en dos grupos, uno con edades comprendidas entre 14 y 20 semanas y otro entre 34 y 40 semanas. Se representa comparativamente los valores determinados en animales control.

Para evaluar directamente la función pancreática, procedimos a la realización de un test de tolerancia a la glucosa mediante la inyección intraperitoneal de suero glucosado hipertónico, con el fin de determinar la eficacia selectiva con la que los ratones carentes de Alx3 son capaces de controlar la hiperglucemia producida. Como muestra la figura 28 en animales jóvenes esta hiperglucemia exhibe una magnitud similar en los animales del grupo control y en los carentes de Alx3, y se recupera con la misma eficacia en ambos grupos durante la primera hora. Sin embargo observamos que a partir de este momento los niveles de glucosa en animales carentes de Alx3 permanecen significativamente elevados en comparación con los animales controles (Figura 31).

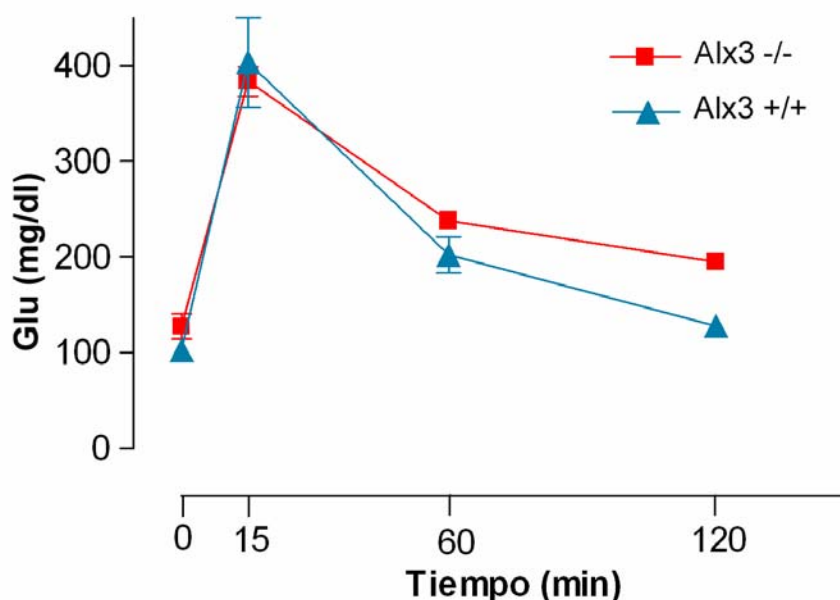


Figura 31: Test de tolerancia a glucosa en animales jóvenes. Se llevaron a cabo en animales control y animales carentes de Alx3, con edades comprendidas entre 14 y 20 semanas. Se representan valores de glucemia determinados antes de una inyección intraperitoneal de glucosa (2 g/kg i.p.), y en los tiempos indicados tras la misma.

Con el fin de investigar si la función de las células β se deteriora con la edad realizamos el test de tolerancia a glucosa en animales maduros, comparando animales del grupo control y carentes de Alx3. La figura 32 muestra cómo al contrario de lo que se observa en los animales jóvenes, la hiperglucemia producida por la inyección

intraperitoneal del suero glucosado es más elevada en los animales carentes de Alx3, y la recuperación al cabo de la primera hora es menos eficiente si la comparamos con los individuos control. Del mismo modo, dos horas después de la inyección de glucosa, los animales carentes de Alx3 presentan todavía niveles de glucosa en sangre significativamente elevados, lo que les diferencia de los animales control, en los cuales, la recuperación de la hiperglucemia es completa (Figura 32).

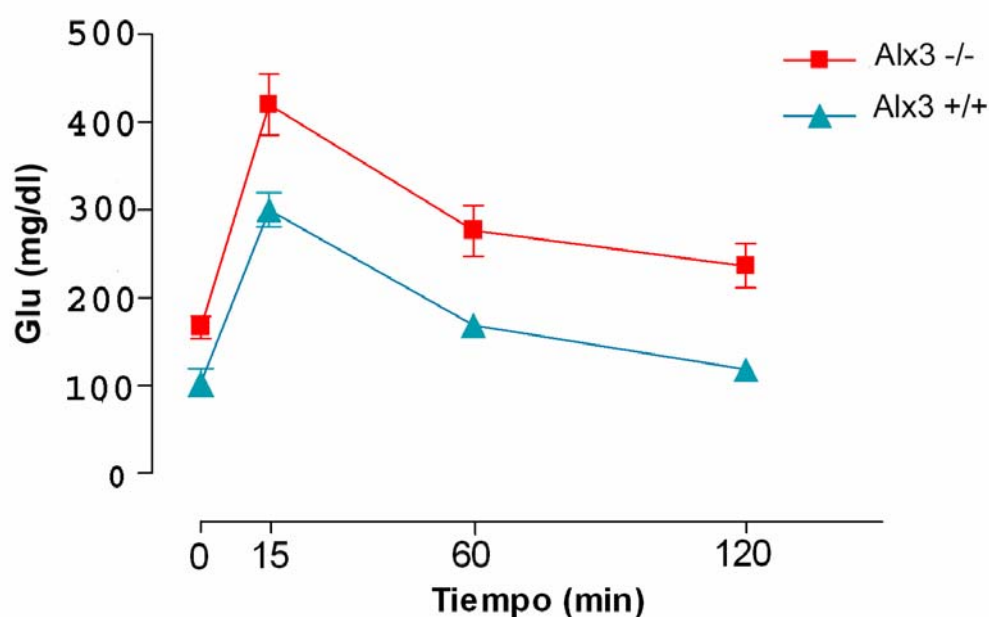


Figura 32: Test de tolerancia a glucosa en animales maduros. Se llevaron a cabo en animales control y animales carentes de Alx3, con edades comprendidas entre 36 y 40 semanas. Se representan valores de glucemia determinados antes de una inyección intraperitoneal de glucosa (2 g/kg i.p.), y en los tiempos indicados tras la misma.

Para investigar en qué medida la carencia de Alx3 afecta la secreción de insulina, determinamos los niveles sanguíneos de esta hormona en animales maduros sometidos al test de tolerancia a glucosa. Como se puede apreciar en la figura 33, mientras los animales control exhiben una cantidad elevada de insulina en sangre 2 horas después de la inducción de la hiperglucemia, lo cual permite la recuperación de la glucemia a niveles basales, los animales carentes de Alx3 muestran una concentración

reducida de insulina que concuerda con los niveles elevados de glucemia observados. Por tanto, la hiperglucemia prolongada observada en ratones deficientes en *Alx3* parece deberse a un déficit en la producción pancreática de insulina y no a un defecto periférico en la acción de esta hormona. Estos resultados indican la existencia de un deterioro funcional en los islotes pancreáticos de los animales deficientes de *Alx3* cuya intensidad aumenta con la edad.

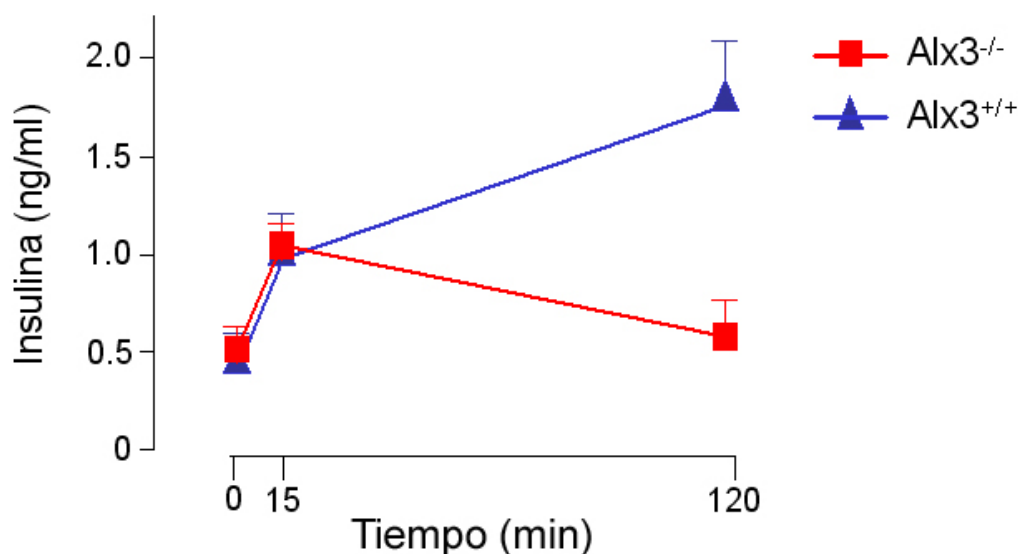


Figura 33: Concentración de insulina en el suero de ratones control y carentes de *Alx3*. Se representan valores de insulina determinados antes de una inyección intraperitoneal de glucosa (2 g/kg i.p.), y en los tiempos indicados tras la misma.

4.9 La carencia de *Alx3* aumenta la susceptibilidad al daño pancreático

Basándonos en estos resultados nos preguntamos si la carencia de *Alx3* podría suponer un aumento en la susceptibilidad al daño pancreático, y por tanto, a diabetes. Por ello sometimos a animales control y carentes de *Alx3* a tratamiento con estreptozotocina y determinamos los niveles de glucosa en sangre antes, durante y después del tratamiento. Esta droga provoca la destrucción progresiva de los islotes, generando un cuadro de diabetes mellitus (Like and Rossini, 1976). La figura 34 muestra cómo efectivamente esta droga produce un daño pancreático progresivo que empieza a ser evidente por la aparición de hiperglucemia en los animales control 2 días después de finalizar el tratamiento. En el caso de los animales carentes de *Alx3* este

daño ancreático aparece de forma más temprana y acusada. Así, los niveles de glucosa en sangre aumentan incluso antes de que finalice el tratamiento y 2 días después del mismo dichos niveles son significativamente más elevados en los animales carentes de Alx3. Esta diferencia se mantiene hasta el final del tratamiento (Figura 34).

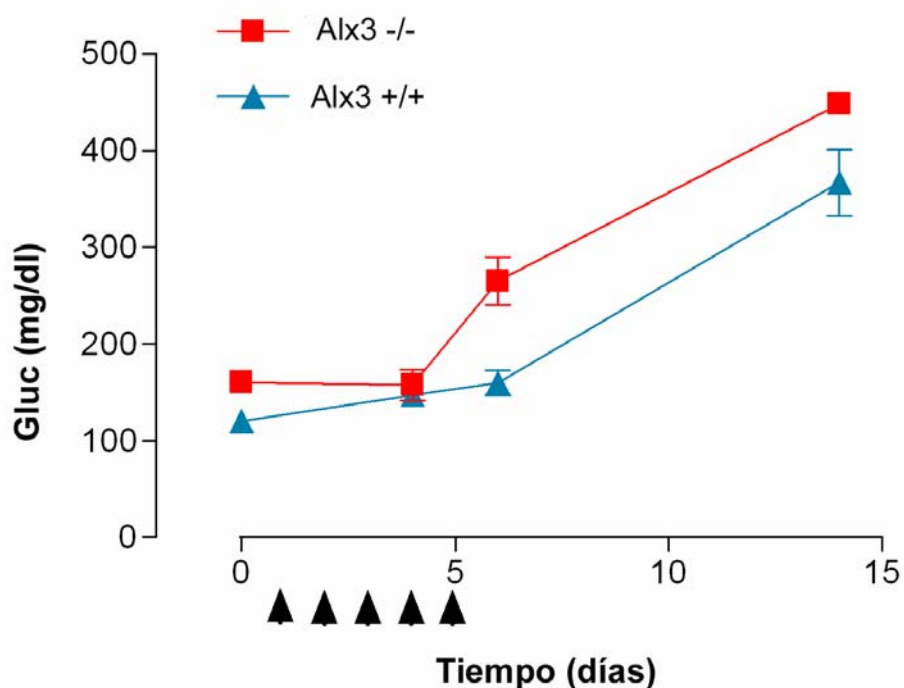


Figura 34: La carencia de Alx3 aumenta la susceptibilidad al daño pancreático Se representa la concentración de glucosa en sangre antes, durante y después de un tratamiento con estreptozotocina (40 mg/kg i.p.) desarrollado durante 5 días. Las flechas representan cada una de las administraciones diarias del tóxico. Nótese que el aumento de la glucemia, indicativo de daño pancreático, aparece prematuramente en animales carentes de Alx3.

Estos resultados indican que los animales carentes de Alx3 son más susceptibles al daño pancreático provocado por estreptozotocina. Esto explica, probablemente, la alta tasa de mortalidad en los ratones deficientes en Alx3 tratados con esta droga en comparación con el grupo control, en el que la supervivencia fue completa. Como se puede apreciar en la figura 35 el número de animales carentes de Alx3 se redujo a la mitad pasados 20 días tras el tratamiento, lo que nos permiten confirmar que el daño pancreático es mayor en los animales carentes de Alx3 que en los animales control.

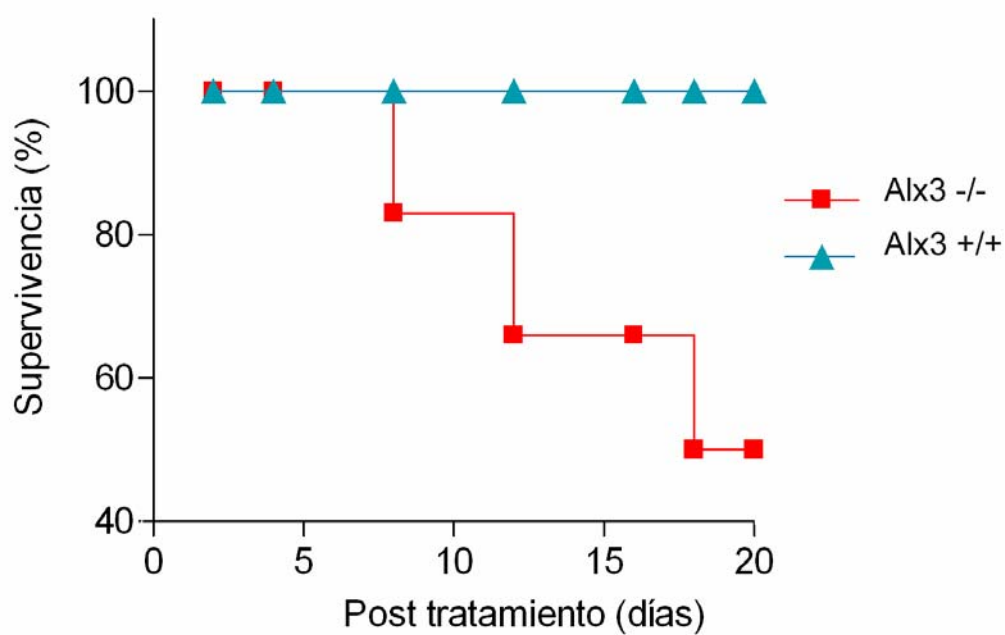


Figura 35: Tasa de supervivencia de los ratones sometidos a tratamiento con estreptozotocina. Los ratones carentes de Alx3 y sus controles fueron sometidos a tratamiento con estreptozotocina (40 mg/kg i.p.) durante 5 días. Se representan los días transcurridos desde el inicio del tratamiento.

Desde que Alx3 fuera identificado por primera vez hace más de 10 años (Rudnick et al., 1994) se han llevado a cabo numerosos estudios encaminados a dilucidar su función durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, hasta la fecha no se han identificado ninguno de los genes diana cuya expresión regula, ni se ha propuesto ninguna hipótesis relacionada con una posible función de Alx3 como regulador de la expresión génica en animales adultos.

En la presente tesis doctoral se han obtenido resultados que han permitido la identificación del primer gen diana conocido regulado por Alx3, que corresponde al gen de insulina, expresado en las células β de los islotes pancreáticos. El papel de Alx3 como regulador de la transcripción del gen de insulina viene apoyado por su expresión de en el páncreas endocrino desde el inicio de la formación de los islotes de Langerhans; por los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina que demuestran la interacción directa de Alx3 con el promotor de insulina; y por los ensayos de transfección transitoria y de interacción proteína-proteína que indican que Alx3 transactiva el gen de insulina a través de su interacción con proteínas bHLH.

Por otro lado, los estudios de esta tesis doctoral realizados sobre animales carentes de Alx3 demuestran que este gen es importante para el funcionamiento de las células β , ya que su carencia altera los mecanismos que controlan el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Este hallazgo es de gran importancia ya que el cuadro de ligera hiperglucemia acompañado de un déficit en la secreción de insulina en ratones deficientes en Alx3 recuerda a los cuadros de diabetes tipo MODY en el humano. Por lo tanto, Alx3 constituye un potencial candidato como agente etiopatogénico en algunos tipos de diabetes humano.

Por último, nuestro trabajo demuestra que Alx3 se expresa en prácticamente todas las células de los islotes pancreáticos, lo cual tiene importantes implicaciones tanto desde el punto de vista del desarrollo embrionario, ya que sugiere un papel en la formación del páncreas endocrino, como desde un punto de vista funcional, ya que sugiere que además de regular la expresión de insulina, Alx3 puede regular la expresión de otros genes pancreáticos en las células α y δ que sintetizan glucagón y somatostatina respectivamente.

5.1 Regulación de la transcripción del gen de insulina por Alx3 en células β pancreáticas.

Un concepto relevante que ha cobrado importancia a raíz de los estudios genéticos realizados sobre genes del grupo *aristaleless* es la existencia de un alto grado de redundancia debido a las funciones solapantes de estos genes. Así, algunas de sus funciones sólo han podido ponerse de manifiesto generando animales mutantes en los que se han inactivado dos o tres de ellos simultáneamente (Qu et al., 1999; Beverdam et al., 2001; Kuijper et al., 2005). Por tanto, es posible que exista también redundancia entre Alx3 y otras proteínas que regulan la expresión del gen de insulina en células β pancreáticas. En nuestros estudios, Alx3 parece funcionar como otros factores de transcripción tipo homeodominio que también cooperan con proteínas bHLH sobre el elemento E2A3/4 del promotor del gen de insulina. Entre estos factores de transcripción se encuentran los factores con homeodominios tipo LIM, Lmx1.1 y Lmx1.2 (Peers et al., 1994; Johnson et al., 1997; Peshavaria et al., 1997; Ohneda et al., 2000b) y Pdx1 (Ohneda et al., 2000b).

Precisamente, Pdx1 ha sido descrito como un importante regulador de la transcripción del gen de insulina tanto en humanos como en roedores (Ohlsson et al., 1993; Peers et al., 1994; Petersen et al., 1994; Serup et al., 1995). Sin embargo, aunque está demostrada su importancia para la función y supervivencia de las células β , parece que Pdx1 no es específicamente necesario para la transcripción del gen de insulina, ya que ésta puede ocurrir aún en ausencia de Pdx1 (Kajimoto et al., 1997; Ahlgren et al., 1998; Johnson et al., 2003). Los trabajos de Kajimoto y cols. (1997) demuestran que la supresión de Pdx1 en células MIN6 no causa ningún descenso en el ARN mensajero de insulina. Estos datos han sido interpretados sobre la base de que otros homeodominios presentes en la célula β podrían compensar la pérdida de Pdx1 interaccionando con las proteínas bHLH sobre el elemento E2A3/4 del promotor de insulina (Ohneda et al., 2000b). Por todo ello es posible que Alx3 pudiera sustituir a Pdx1 como parecen hacerlo los factores de transcripción Lmx1.1 y Lmx1.2 (Ohneda et al., 2000b). Es decir, la pérdida de un único factor de transcripción no parece ser suficiente para comprometer seriamente la transcripción del gen de insulina ya que dicho proceso probablemente es el resultado de la actividad coordinada de varios de estos factores que pueden compensarse unos a otros.

5.2 Alx3 regula la expresión de insulina mediante su interacción con E47/Pan1

Nuestros estudios demuestran que Alx3 interacciona directamente con la proteína E47/Pan1, y que esta interacción es importante para la expresión del gen de insulina.

Las proteínas bHLH comprenden una gran familia de factores de transcripción que se unen a elementos reguladores caracterizados por la presencia de secuencias conocidas como cajas E. Los factores de transcripción bHLH E47/Pan1 y Beta2 unidos al elemento regulador E2 interaccionan con otras proteínas homeodominio unidas al elemento A3/4 del gen de insulina que se encuentra adyacente al elemento E2 (German et al., 1992; Ohneda et al., 2000b).

Entre las proteínas homeodominio con las que interaccionan se encuentra el factor de transcripción Lmx1. Lmx1 fue identificado en una línea celular β - pancreática y coopera sinérgicamente con E47/Pan1 para activar al promotor de insulina en fibroblastos transfectados (German et al., 1992). Esta sinergia transcripcional se debe a la interacción física entre Lmx1, a través de su dominio LIM2, y el dominio bHLH de E47/Pan1 (Johnson et al., 1997). En el caso de Isl1, proteína homeodominio que juega un importante papel en la formación de los islotes pancreáticos (Gradwohl et al., 2000), trabajos recientes han mostrado que aunque es incapaz de interaccionar con E47/Pan1 sí interacciona físicamente con Beta2, actuando sinérgicamente sobre el promotor de insulina (Peng et al., 2005).

Otro factor de transcripción con el que también interaccionan es Pdx1. Ohneda y cols. (2000) demostraron que Pdx1 interacciona tanto con E47/Pan1 como con Beta2 sobre el elemento E2A3/4 para promover la activación del promotor de insulina, hallazgos que fueron confirmados por Glick y cols. (2002). Nuestros datos indican que la activación sinérgica producida por Alx3 y E47/Pan1 podría explicarse a dos niveles diferentes. Por un lado podría deberse a la interacción directa entre las dos proteínas a través del homeodominio de Alx3 unido al elemento E2A3/4 del promotor de insulina. Así, E47/Pan1 reclutaría a Beta2 al complejo transcripcional, ya que Alx3 no interacciona directamente con este factor. Por otro lado, influirían las interacciones funcionales de los dominios de transactivación de estos factores de transcripción que actuarían reclutando proteínas coactivadores que no pueden interaccionar establemente con cada factor por separado.

Además, la capacidad de Alx3 para interactuar directamente con E47/Pan1 parece favorecer su unión al ADN cooperativamente. A su vez, el reclutamiento de Beta2 formaría un complejo multiproteico funcionalmente activo ensamblado sobre el elemento E2A3/4. Es decir, estos datos refuerzan la idea de que la activación sinérgica del promotor de insulina ocurre como consecuencia de la unión cooperativa al ADN que promueve el reclutamiento de múltiples activadores (Ohneda et al., 2000a).

La unión de E47/Pan1 al promotor de insulina ha sido documentada con anterioridad en diferentes trabajos, no obstante, la mayoría muestran la unión de este factor de transcripción al elemento E1 del promotor. (Nelson et al., 1990; Vierra and Nelson 1995). En otros estudios (Peers et al., 1994), aunque sí se muestra la unión de E47/Pan1 al elemento E2A3/4 los autores utilizaron E47/Pan1 recombinante producido en bacterias, lo que a diferencia del sistema de lisado de reticulocitos utilizado en esta tesis, permitió obtener una cantidad mayor de proteína. De hecho, en nuestros estudios la unión de E47/Pan1 al elemento E2 es sólo perceptible cuando Alx3 está presente. Por tanto, es posible que la capacidad de unión de E47/Pan1 por sí solo al elemento E2 sea menor de lo que se ha venido estimando, ya que en los experimentos realizados por los mencionados investigadores se utilizaron cantidades de E47/Pan1 recombinante que exceden ampliamente a las que se encuentran normalmente en el núcleo celular. Así, Ohneda y cols. (2000) utilizan cantidades que oscilan entre 6 y 30 ng de E47/Pan1, mientras que en el caso de Pdx1 detectan unión con 160 pg. Además nuestros ensayos de inmunoprecipitación de cromatina demuestran que E47/Pan1 no ocupa el promotor de insulina a menos que Alx3 este presente en la célula. Por tanto, estos datos ponen en entredicho la idea generalmente sostenida, pero pobremente documentada, según la cual E47/Pan1 tiene capacidad intrínseca para unirse específicamente al elemento E2A3/4. Por otro lado esta aparente dificultad de E47/Pan1 para interactuar libremente con el elemento E2A3/4 nos llevó a contemplar la posibilidad de que E47/Pan1 pudiera interactuar con Alx3 en ausencia del sitio E2. Como muestra la figura 24, E47/Pan1 y Alx3 forman un complejo de mayor peso molecular aún cuando la sonda utilizada carece de la región E2, sitio consenso de unión para E47/Pan1. Es decir, E47/Pan1 sería capaz de interactuar con Alx3 sin que aquél contacte directamente con el ADN. Una situación análoga ocurre entre el factor de transcripción bHLH dHAND y la proteína homedominio Arix, que interactúan para potenciar la actividad del promotor del gen de la dopamina β hidroxilasa sin que dHAND se una directamente al ADN (Rychlik et al., 2005).

Existen varios estudios que ilustran la activación transcripcional de diferentes genes sin que haya una directa al ADN de todos los factores de transcripción implicados. Así, Thuerauf y cols. (1998) mostraron un mecanismo por el cual el factor ATFG, una vez fosforilado, interacciona directamente con el factor de respuesta a suero (SRF) sin hacer contacto con el ADN, y es éste el que al interaccionar con las secuencias consenso SRE (elementos de respuesta a suero) del ADN induce la transcripción. Un modelo similar al presentado por Thuerauf y cols. (1998) es el descrito por Ubeda y cols. (1999). En este caso la proteína CHOP (*C/EBP homologous protein*) interacciona con factores de transcripción de la familia AP-1, como c-Jun, Jun-D y c-Fos, produciendo la activación de genes como somatostatina, Jun-D y colagenasa. Este trabajo demuestra que para que tenga lugar dicha activación se forma un complejo en el que CHOP, sin unirse directamente al ADN, interacciona con los miembros de la familia AP-1 y son éstos los que se unen directamente con los sitios consenso TRE del ADN produciendo la activación de sus genes diana.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demuestran que la integridad de los dominios Pro1 y Pro2 es necesaria para que Alx3 tenga capacidad de transactivación transcripcional, lo que indica que el dominio Pro3 es incapaz de funcionar aisladamente (Pérez-Villamil et al., 2004). Sin embargo, en este trabajo hemos demostrado que cuando Alx3 actúa sobre el elemento E2A3/4 en presencia de E47/Pan1, el dominio Pro3 de Alx3 es todavía capaz de interaccionar sinérgicamente con la proteína bHLH, cuya actividad es a su vez dependiente de la integridad del dominio de transactivación AD1.

Curiosamente, E47/Pan1 es capaz de estimular la transcripción, aunque de manera relativamente débil, aún cuando todos los dominios ricos en prolina de Alx3 han sido eliminados. Habida cuenta de que la actividad transcripcional solo puede provenir del dominio de transactivación de E47/Pan1, podemos afirmar que el homeodominio de Alx3 es suficiente para reclutar a E47/Pan1 al complejo transcripcional ensamblado sobre el promotor de insulina. De hecho, nuestros experimentos *in vitro* demuestran que el homeodominio de Alx3 es suficiente para heterodimerizar con E47/Pan1.

El mecanismo por el cual los dominios de transactivación de Alx3 y las proteínas bHLH actúan sinérgicamente no ha sido explorado en nuestro estudio. Sin embargo, trabajos previos (Qui et al., 2001) y nuestros propios datos sugieren que la interacción de coactivadores tales como CBP/p300 podría estar involucrada. Otras proteínas homeodominio como Pdx1 y la proteína bHLH Beta2 interaccionan con el coactivador

CBP/p300 y actúan sinérgicamente para transactivar el promotor de insulina (Qiu et al., 2002).

Es posible que otros mecanismos adicionales que suponen la interacción con diferentes tipos de proteínas contribuyan a la transactivación sinérgica de Alx3 y E47/Pan1, como por ejemplo el reclutamiento de coactivadores como Bridge1. Se ha visto que esta proteína incrementa la activación transcripcional de Pdx1 en los promotores de somatostatina e insulina (Stanojevic et al., 2005). Junto a Bridge1 otros trabajos han mostrado cómo la interacción de proteínas de la familia HMG parecen tener un papel relevante en la interacción sinérgica entre Pdx1 y E47/Pan1 (Ohneda et al., 2000b). Estos podrían ser por tanto otros posibles mecanismos que contribuyeran al sinergismo observado entre Alx3 y E47/Pan1.

Finalmente, también es posible que Alx3 pudiese alterar la conformación de cromatina para favorecer la unión de otros factores de transcripción o coactivadores. Esto es lo que ocurre con HNF1 α , el cual actúa como activador transcripcional del gen de insulina sólo en aquellos contextos específicos del tipo celular y promotor en los que es necesario reclutar la actividad histona acetilasa (Parrizas et al., 2001).

5.3 Unión de Alx3 al elemento A3/4

Nuestro trabajo ha demostrado que Alx3 se une en células β pancreáticas al elemento A3/4 del promotor de insulina. Aunque Alx3 se une a este elemento regulador preferentemente como dímero, cuando es sintetizada *in vitro* se puede observar un complejo menos intenso que corresponde a la forma monomérica. Alx3 pertenece al subgrupo Q50 de las proteínas homeodominio de la clase paired caracterizadas por la presencia de un residuo de glutamina en la posición 50 del homeodominio (Miller et al., 1992). Las proteínas de este grupo se caracterizan por unirse a los denominados elementos P, que consisten en repeticiones palindrómicas de la secuencia TAAT separadas entre sí por un número variable de nucleótidos. En concreto, se unen de manera cooperativa como dímeros a los elementos P3, dos sitios TAAT separados por tres nucleótidos, y como monómeros a los elementos P5, dos sitios TAAT separados por cinco nucleótidos (Wilson et al., 1993). Este hecho ha sido confirmado previamente con Alx4 y Cart1 (Qu et al., 1997; Qu et al., 1999; Tucker and Wisdom 1999; Furukawa et

al., 2002). Brouwer y cols. (2003) mostraron que la unión de Alx3 a P3 es inhibida por el dominio aristaless de Cart1, sugiriendo que las secuencias localizadas fuera del homedominio pueden afectar la unión de proteínas aristaless a sus genes diana. Trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que un segmento de Alx3 que corresponde al homeodominio contiene suficiente información estructural para unirse a sitios P3 y P5, y que la unión monomérica a P5 no es suficiente para la actividad funcional (Pérez-Villamil et al., 2004). El elemento A3/4 contiene la secuencia TAATCTAATTA que se asemeja a los sitios P3. Además Alx3 se une con relativa afinidad al motivo palindrómico TAATTA situado dentro de esta secuencia (Pérez-Villamil et al., 2004). Estos datos sugieren que Alx3 dimeriza cooperativamente sobre el elemento A3/4 lo cual ha sido demostrado por nosotros en el caso concreto del gen de insulina.

5.4 Importancia funcional de Alx3 para el mantenimiento de la glucemia

Nuestros resultados obtenidos con animales *in vivo* muestran que Alx3 es importante para el mantenimiento de la homeostasis glucémica. Así, los ratones carentes de Alx3 presentan niveles basales de glucemia anormalmente elevados, situación que parece ser debida a la existencia de un deterioro progresivo de los islotes que empeora con la edad.

Además, la observación de que en los tests de tolerancia a glucosa la prolongada hiperglucemia detectada en ratones deficientes en Alx3 se acompaña de una caída en la concentración de insulina en sangre, refuerza la idea de un defecto a nivel de los islotes pancreáticos en oposición a un aumento de la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos, posibilidad que no puede descartarse a priori ya que la expresión de Alx3 en estos órganos no ha sido explorada.

Si consideramos que Alx3 funciona en las células β de manera análoga a como lo hace Pdx1, hemos de hacer notar que la reducción anómala de la insulinemia en ratones carentes de Alx3 estimulados con glucosa no tiene por qué deberse necesariamente a un defecto en la transcripción del gen de insulina, y por tanto en la síntesis de la hormona, ya que si tenemos en cuenta la capacidad de Pdx1 y de otros factores de transcripción para transactivar el gen de insulina, la ausencia de Alx3 posiblemente no sea suficiente

para suprimir completamente la transcripción del gen. De hecho, Kajimoto y cols. (1997) ya demostraron que la reducción de los niveles de Pdx1 en células MIN6 no supone alteración alguna en la transcripción del gen de insulina.

Por el contrario, es probable que estos niveles reducidos de insulina se deban a un defecto en la secreción de la hormona. Los trabajos de Wollheim y cols. (2004) muestran cómo la expresión de una forma dominante negativa Pdx1 en islotes pancreáticos de rata produce una marcada inhibición en la secreción de insulina en respuesta a glucosa. Este mismo trabajo muestra cómo en ausencia de Pdx1 se ve reducida la expresión de un factor de transcripción mitocondrial, TFAM, que ocasiona la alteración en la expresión de genes que participan en el metabolismo mitocondrial cuya consecuencia es una secreción anómala de insulina. Junto a éste, otros trabajos han mostrado también la importancia de Pdx1 en la regulación del metabolismo mitocondrial. Así, Brissova y cols. (2002) observaron que los ratones con una mutación en heterocigosis para Pdx1 presentan alteraciones en la función mitocondrial que cursan con anomalías en la generación de NADPH, y en la movilización de calcio intracelular, que produce una disminución en la secreción de insulina.

En nuestros estudios no hemos evaluado la posibilidad de la existencia de un defecto en el metabolismo mitocondrial por la ausencia de Alx3, pero si tenemos en cuenta las similitudes entre Alx3 y Pdx1 quizás la carencia de Alx3 pueda producir también defectos en la secreción de la hormona, aspecto que pretendemos abordar en futuras investigaciones.

A pesar de lo anteriormente expuesto, no pueden descartarse otros mecanismos para explicar la hipoinsulinemia en presencia de hiperglucemia en los ratones deficientes en Alx3. Esta afirmación se apoya en estudios realizados por Johnson y cols. (2003) en los que se evaluaron los efectos de la reducción de los niveles de Pdx1 sobre la secreción de insulina *in vivo*. Estos autores observaron que los ratones heterocigotos en los que se ha inactivado sólo un alelo de Pdx1 no son capaces de liberar niveles de insulina suficientes para controlar la glucemia en un test de tolerancia a la glucosa, lo cual empeora con la edad. Sin embargo, determinamos que ello no es debido a un defecto directo en la secreción de insulina, que parece normal, sino en una mayor susceptibilidad de los islotes que tiene como consecuencia la aparición de un número de células apoptóticas anormalmente elevado en los ratones deficientes en Pdx1.

Nuestros datos son consistentes con la existencia de una situación similar en el caso del déficit de Alx3, ya que éste produce un defecto progresivo en la regulación de la

glucemia. Además nuestros experimentos con estreptozotocina indican que en ausencia de Alx3 los islotes pancreáticos son más susceptibles a padecer daño conducente a la aparición de una diabetes severa.

5.5 Alx3 y diabetes tipo MODY

Los datos obtenidos en este trabajo nos permiten plantear la hipótesis según la cual Alx3 puede ser un posible candidato para las diabetes monogénicas tipo MODY. Esta hipótesis se basa en observaciones que indican que Alx3 es un factor de transcripción que se comporta en la célula β de manera muy similar a Pdx1. Así, ambos se expresan en páncreas de forma tardía durante el desarrollo embrionario (aunque Pdx1 también se expresa transitoriamente en el endodermo prepancreático); ambos regulan la transcripción del gen de insulina a nivel del elemento A3/4 del promotor; y ambos lo hacen sinérgicamente a través de una interacción directa con E47/Pan1. Además, que el fenotipo de los ratones deficientes en Alx3, en los que el defecto pancreático es relativamente leve, empeore con la edad y se ponga abiertamente de manifiesto tras la estimulación hiperglucémica, es compatible con esta idea.

Como ya hemos mencionado anteriormente, cinco de los seis tipos de diabetes tipo MODY conocidos hasta el momento se deben a mutaciones en genes que codifican factores de transcripción relevantes para la función de la célula β pancreática. Estos factores actúan tanto a nivel del desarrollo pancreático como a nivel de la célula β diferenciada. Diversos trabajos han demostrado la existencia de una relación funcional entre estas proteínas. Así, los trabajos de Kuo y cols. (1992) muestran cómo HNF4 α (MODY1) activa el promotor de HNF1 α (MODY3) (Kuo et al., 1992). Por otro lado, Wang y cols. (2004) mostraron que el páncreas de ratones deficientes para HNF1 β (MODY5) presenta niveles elevados del mensajero de Pdx1 (MODY4) y HNF1 α y niveles reducidos del mensajero de HNF4 α (Wang et al., 2004). Teniendo en cuenta estas interacciones es importante destacar que Alx3 está funcionalmente relacionado con varios de los genes cuya mutación da lugar a MODY. Así, en este trabajo, hemos demostrado cómo Alx3 actúa en combinación con Beta2 (MODY6), para activar sinérgicamente el promotor de insulina, y cómo se une a los mismos elementos

reguladores del promotor de insulina a los que se unen Pdx1 (MODY4) (Ohneda et al., 2000b) y HNF1 α (MODY3) (Emens et al., 1992).

Por tanto, habida cuenta de que aún existen cuadros de diabetes que clínicamente pueden catalogarse como MODY (Vaxillaire and Froguel, 2006), pero cuya etiología es desconocida, es factible proponer a Alx3 como posible candidato, posibilidad que podrá evaluarse en estudios clínicos realizados en el futuro.

Las conclusiones de la presente tesis doctoral son las siguientes:

1. Alx3 se expresa en líneas celulares productoras de insulina y somatostatina, así como en islotes pancreáticos.
2. Alx3 se une de manera específica al elemento A3/4 del promotor de insulina.
3. Alx3 induce la activación del promotor de insulina en combinación con factores de transcripción tipo bHLH.
4. Alx3 interacciona directamente con E47/Pan1 pero no con Beta2.
5. El homeodominio de Alx3 promueve la unión de E47/Pan1 al elemento E2A3/4 para estimular la transcripción del gen de insulina.
6. Alx3 participa en los mecanismos que regulan el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa a través de la liberación de insulina en sangre.
7. La carencia de Alx3 aumenta la susceptibilidad al daño pancreático.

BIBLIOGRAFÍA

Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K., and Edlund, H. (1998). beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* **12**: 1763-1768.

Ahlgren, U., Pfaff, S.L., Jessell, T.M., Edlund, T., and Edlund, H. (1997). Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* **385**: 257-260.

Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M.E. (1995). Notch signaling. *Science* **268**: 225-232.

Artner, I., Le Lay, J., Hang, Y., Elghazi, L., Schisler, J.C., Henderson, E., Sosa-Pineda, B., and Stein, R. (2006). MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells. *Diabetes* **55**: 297-304.

Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P.A., and Wollheim, C.B. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* **130**: 167-178.

Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B., Campbell, W.R., and Fletcher, A.A. (1991). Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. 1922. *Can Med Association Journal* **145**: 1281-1286.

Barbacci, E., Reber, M., Ott, M.O., Breillat, C., Huetz, F., and Cereghini, S. (1999). Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* **126**: 4795-4805.

Beverdam, A., Brouwer, A., Reijnen, M., Korving, J., and Meijlink, F. (2001). Severe nasal clefting and abnormal embryonic apoptosis in *Alx3/Alx4* double mutant mice. *Development* **128**: 3975-3986.

Boden, G. and Shulman, G.I. (2002). Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* **32 Suppl 3**: 14-23.

Bort, R., Martinez-Barbera, J.P., Beddington, R.S., and Zaret, K.S. (2004). Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas. *Development* **131**: 797-806.

Brissova, M., Shiota, M., Nicholson, W.E., Gannon, M., Knobel, S.M., Piston, D.W., Wright, C.V., and Powers, A.C. (2002). Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* **277**: 11225-11232.

Brouwer, A., ten Berge, D., Wiegerinck, R., and Meijlink, F. (2003). The OAR/aristaless domain of the homeodomain protein Cart1 has an attenuating role in vivo. *Mech Dev* **120**: 241-252.

Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**: 102-110.

Cissell, M.A., Zhao, L., Sussel, L., Henderson, E., and Stein, R. (2003). Transcription factor occupancy of the insulin gene in vivo. Evidence for direct regulation by Nkx2.2. *J Biol Chem* **278**: 751-756.

Coffinier, C., Barra, J., Babinet, C., and Yaniv, M. (1999). Expression of the vHNF1/HNF1beta homeoprotein gene during mouse organogenesis. *Mech Dev* **89**: 211-213.

Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-Sorensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohl, G., and Gruss, P. (2003). Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev* **17**: 2591-2603.

Crowe, D.T. and Tsai, M.J. (1989). Mutagenesis of the rat insulin II 5'-flanking region defines sequences important for expression in HIT cells. *Mol Cell Biol* **9**: 1784-1789.

Chen, W.S., Manova, K., Weinstein, D.C., Duncan, S.A., Plump, A.S., Prezioso, V.R., Bachvarova, R.F., and Darnell, J.E., Jr. (1994). Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev* **8**: 2466-2477.

Daniel, P.B., Walker, W.H., and Habener, J.F. (1998). Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu Rev Nutr* **18**: 353-383.

Dean, P.M. and Matthews, E.K. (1968). Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* **219**: 389-390.

Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M., Lora, J., and Zaret, K.S. (2001). A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* **128**: 871-881.

Dumonteil, E., Laser, B., Constant, I., and Philippe, J. (1998). Differential regulation of the glucagon and insulin I gene promoters by the basic helix-loop-helix transcription factors E47 and BETA2. *J Biol Chem* **273**: 19945-19954.

Eckner, R., Yao, T.P., Oldread, E., and Livingston, D.M. (1996). Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev* **10**: 2478-2490.

Edlund, H. (2001). Factors controlling pancreatic cell differentiation and function. *Diabetologia* **44**: 1071-1079.

Foulkes, N.S., Borrelli, E., and Sassone-Corsi, P. (1991). CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* **64**: 739-749.

Froguel, P. and Velho, G. (1999). Molecular Genetics of Maturity-onset Diabetes of the Young. *Trends Endocrinol Metab* **10**: 142-146.

Froguel, P., Zouali, H., Vionnet, N., Velho, G., Vaxillaire, M., Sun, F., Lesage, S., Stoffel, M., Takeda, J., Passa, P., and et al., (1993). Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* **328**: 697-702.

Furukawa, K., Iioka, T., Morishita, M., Yamaguchi, A., Shindo, H., Namba, H., Yamashita, S., and Tsukazaki, T. (2002). Functional domains of paired-like homeoprotein Cart1 and the relationship between dimerization and transcription activity. *Genes Cells* **7**: 1135-1147.

Gauthier, B.R., Brun, T., Sarret, E.J., Ishihara, H., Schaad, O., Descombes, P., and Wollheim, C.B. (2004). Oligonucleotide microarray analysis reveals PDX1 as an essential regulator of mitochondrial metabolism in rat islets. *J Biol Chem* **279**: 31121-31130.

German, M.S. (1993). Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1781-1785.

German, M.S., Wang, J., Chadwick, R.B., and Rutter, W.J. (1992). Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev* **6**: 2165-2176.

Girard, J., Ferre, P., and Foufelle, F. (1997). Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu Rev Nutr* **17**: 325-352.

Gittes, G.K. and Rutter, W.J. (1992). Onset of cell-specific gene expression in the developing mouse pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1128-1132.

Glick, E., Leshkowitz, D., and Walker, M.D. (2000). Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDX1 to activate the insulin gene promoter. *J Biol Chem* **275**: 2199-2204.

Goore, M.Y. and Thompson, J.F. (1967). Gamma-glutamyl transpeptidase of kidney bean fruit. II. Studies on the activating effect of sodium citrate. *Biochim Biophys Acta* **132**: 27-32.

Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., and Guillemot, F. (2000). neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1607-1611.

Grapin-Botton, A., Majithia, A.R., and Melton, D.A. (2001). Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. *Genes Dev* **15**: 444-454.

Grodsky, G.M. and Bennett, L.L. (1963). Insulin Secretion From The Isolated Pancreas In Absence Of Insulinogenesis: Effect Of Glucose. *Proc Soc Exp Biol Med* **114**: 769-771.

Grodsky, G.M. and Bennett, L.L (1966). Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas. *Diabetes* **15**: 910-913.

Gu, G., Dubauskaite, J., and Melton, D.A. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* **129**: 2447-2457.

Hani, E.H., Stoffers, D.A., Chevre, J.C., Durand, E., Stanojevic, V., Dina, C., Habener, J.F., and Froguel, P. (1999). Defective mutations in the insulin promoter factor-1 (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* **104**: R41-48.

Hebrok, M., Kim, S.K., and Melton, D.A. (1998). Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* **12**: 1705-1713.

Heremans, Y., Van De Casteele, M., in't Veld, P., Gradwohl, G., Serup, P., Madsen, O., Pipeleers, D., and Heimberg, H. (2002). Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol* **159**: 303-312.

Herrera, P.L., Huarte, J., Sanvito, F., Meda, P., Orci, L., and Vassalli, J.D. (1991). Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene. *Development* **113**: 1257-1265.

Holz, G.G. and Habener, J.F. (1992). Signal transduction crosstalk in the endocrine system: pancreatic beta-cells and the glucose competence concept. *Trends Biochem Sci* **17**: 388-393.

Huang, H.P., Chu, K., Nemoz-Gaillard, E., Elberg, D., and Tsai, M.J. (2002). Neogenesis of beta-cells in adult BETA2/NeuroD-deficient mice. *Mol Endocrinol* **16**: 541-551.

Hussain, M.A., Lee, J., Miller, C.P., and Habener, J.F. (1997). POU domain transcription factor brain 4 confers pancreatic alpha-cell-specific expression of the proglucagon gene through interaction with a novel proximal promoter G1 element. *Mol Cell Biol* **17**: 7186-7194.

Inada, A., Someya, Y., Yamada, Y., Ihara, Y., Kubota, A., Ban, N., Watanabe, R., Tsuda, K., and Seino, Y. (1999). The cyclic AMP response element modulator family regulates the insulin gene transcription by interacting with transcription factor IID. *J Biol Chem* **274**: 21095-21103.

Inagaki, N., Maekawa, T., Sudo, T., Ishii, S., Seino, Y., and Imura, H. (1992). c-Jun represses the human insulin promoter activity that depends on multiple cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1045-1049.

Jacquemin, P., Durviaux, S.M., Jensen, J., Godfraind, C., Gradwohl, G., Guillemot, F., Madsen, O.D., Carmeliet, P., Dewerchin, M., Collen, D., Rousseau, G.G., and Lemaigre, F.P. (2000). Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates

pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene *ngn3*. *Mol Cell Biol* **20**: 4445-4454.

Johnson, J.D., Ahmed, N.T., Luciani, D.S., Han, Z., Tran, H., Fujita, J., Misler, S., Edlund, H., and Polonsky, K.S. (2003). Increased islet apoptosis in *Pdx1*^{+/-} mice. *J Clin Invest* **111**: 1147-1160.

Johnson, J.D., Zhang, W., Rudnick, A., Rutter, W.J., and German, M.S. (1997). Transcriptional synergy between LIM-homeodomain proteins and basic helix-loop-helix proteins: the LIM2 domain determines specificity. *Mol Cell Biol* **17**: 3488-3496.

Jonas, J.C., Sharma, A., Hasenkamp, W., Ilkova, H., Patane, G., Laybutt, R., Bonner-Weir, S., and Weir, G.C. (1999). Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* **274**: 14112-14121.

Kajimoto, Y., Watada, H., Matsuoka, T., Kaneto, H., Fujitani, Y., Miyazaki, J., and Yamasaki, Y. (1997). Suppression of transcription factor PDX-1/IPF1/STF-1/IDX-1 causes no decrease in insulin mRNA in MIN6 cells. *J Clin Invest* **100**: 1840-1846.

Kataoka, K., Han, S.I., Shioda, S., Hirai, M., Nishizawa, M., and Handa, H. (2002). MafA is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J Biol Chem* **277**: 49903-49910.

Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R.J., and Wright, C.V. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* **32**: 128-134.

Krapp, A., Knofler, M., Frutiger, S., Hughes, G.J., Hagenbuchle, O., and Wellauer, P.K. (1996). The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *Embo J* **15**: 4317-4329.

Krapp, A., Knofler, M., Ledermann, B., Burki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbuchle, O., and Wellauer, P.K. (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev* **12**: 3752-3763.

Kuijper, S., Beverdam, A., Kroon, C., Brouwer, A., Candille, S., Barsh, G., and Meijlink, F. (2005). Genetics of shoulder girdle formation: roles of Tbx15 and aristaless-like genes. *Development* **132**: 1601-1610.

Kuo, C.J., Conley, P.B., Chen, L., Sladek, F.M., Darnell, J.E., Jr., and Crabtree, G.R. (1992). A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* **355**: 457-461.

Lee, J.C., Smith, S.B., Watada, H., Lin, J., Scheel, D., Wang, J., Mirmira, R.G., and German, M.S. (2001). Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* **50**: 928-936.

Lee, Y.H., Sauer, B., and Gonzalez, F.J. (1998). Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1alpha knockout mouse. *Mol Cell Biol* **18**: 3059-3068.

Li, H., Arber, S., Jessell, T.M., and Edlund, H. (1999). Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. *Nat Genet* **23**: 67-70.

Like, A.A. and Rossini, A.A. (1976). Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* **193**: 415-417.

Macfarlane, W.M., Frayling, T.M., Ellard, S., Evans, J.C., Allen, L.I., Bulman, M.P., Ayres, S., Shepherd, M., Clark, P., Millward, A., Demaine, A., Wilkin, T., Docherty, K., and Hattersley, A.T. (1999). Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *J Clin Invest* **104**: R33-39.

Maestro, M.A., Boj, S.F., Luco, R.F., Pierreux, C.E., Cabedo, J., Servitja, J.M., German, M.S., Rousseau, G.G., Lemaigre, F.P., and Ferrer, J. (2003). Hnf6 and Tcf2 (MODY5) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas. *Hum Mol Genet* **12**: 3307-3314.

Malecki, M.T., Jhala, U.S., Antonellis, A., Fields, L., Doria, A., Orban, T., Saad, M., Warram, J.H., Montminy, M., and Krolewski, A.S. (1999). Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* **23**: 323-328.

Massari, M.E. and Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**: 429-440.

McGarry, J.D. and Dobbins, R.L. (1999). Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* **42**: 128-138.

Mellitzer, G., Bonne, S., Luco, R.F., Van De Casteele, M., Lenne-Samuel, N., Collombat, P., Mansouri, A., Lee, J., Lan, M., Pipeleers, D., Nielsen, F.C., Ferrer, J., Gradwohl, G., and Heimberg, H. (2006). IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas. *Embo J* **25**: 1344-1352.

Milner, R.D. and Hales, C.N. (1967). The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studied in vitro. *Diabetologia* **3**: 47-49.

Miller, C.P., McGehee, R.E., Jr., and Habener, J.F. (1994). IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *Embo J* **13**: 1145-1156.

Miller, D.M., Shen, M.M., Shamu, C.E., Burglin, T.R., Ruvkun, G., Dubois, M.L., Ghee, M., and Wilson, L. (1992). *C. elegans* unc-4 gene encodes a homeodomain protein that determines the pattern of synaptic input to specific motor neurons. *Nature* **355**: 841-845.

- Miquerol, L., Lopez, S., Cartier, N., Tulliez, M., Raymondjean, M., and Kahn, A. (1994). Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *J Biol Chem* **269**: 8944-8951.
- Nakayama, M., Abiru, N., Moriyama, H., Babaya, N., Liu, E., Miao, D., Yu, L., Wegmann, D.R., Hutton, J.C., Elliott, J.F., and Eisenbarth, G.S. (2005). Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* **435**: 220-223.
- Naya, F.J., Huang, H.P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F.J., Leiter, A.B., and Tsai, M.J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* **11**: 2323-2334.
- Naya, F.J., Stellrecht, C.M., and Tsai, M.J. (1995). Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev* **9**: 1009-1019.
- Nelson, C., Shen, L.P., Meister, A., Fodor, E., and Rutter, W.J. (1990). Pan: a transcriptional regulator that binds chymotrypsin, insulin, and AP-4 enhancer motifs. *Genes Dev* **4**: 1035-1043.
- Obata, J., Yano, M., Mimura, H., Goto, T., Nakayama, R., Mibu, Y., Oka, C., and Kawaichi, M. (2001). p48 subunit of mouse PTF1 binds to RBP-Jkappa/CBF-1, the intracellular mediator of Notch signalling, and is expressed in the neural tube of early stage embryos. *Genes Cells* **6**: 345-360.
- Ohlsson, H., Karlsson, K., and Edlund, T. (1993). IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *Embo J* **12**: 4251-4259.
- Ohneda, K., Ee, H., and German, M. (2000a). Regulation of insulin gene transcription. *Semin Cell Dev Biol* **11**: 227-233.

Ohneda, K., Mirmira, R.G., Wang, J., Johnson, J.D., and German, M.S. (2000b). The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Mol Cell Biol* **20**: 900-911.

Olson, L.K., Qian, J., and Poitout, V. (1998). Glucose rapidly and reversibly decreases INS-1 cell insulin gene transcription via decrements in STF-1 and C1 activator transcription factor activity. *Mol Endocrinol* **12**: 207-219.

Parrizas, M., Maestro, M.A., Boj, S.F., Paniagua, A., Casamitjana, R., Gomis, R., Rivera, F., and Ferrer, J. (2001). Hepatic nuclear factor 1-alpha directs nucleosomal hyperacetylation to its tissue-specific transcriptional targets. *Mol Cell Biol* **21**: 3234-3243.

Peers, B., Leonard, J., Sharma, S., Teitelman, G., and Montminy, M.R. (1994). Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol Endocrinol* **8**: 1798-1806.

Peng, S.Y., Wang, W.P., Meng, J., Li, T., Zhang, H., Li, Y.M., Chen, P., Ma, K.T., and Zhou, C.Y. (2005). ISL1 physically interacts with BETA2 to promote insulin gene transcriptional synergy in non-beta cells. *Biochim Biophys Acta* **1731**: 154-159.

Pérez-Moreno, M.A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M.A., and Cano, A. (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* **276**: 27424-27431.

Pérez-Villamil, B., Mirasierra, M., and Vallejo, M. (2004). The homeoprotein Alx3 contains discrete functional domains and exhibits cell-specific and selective monomeric binding and transactivation. *J Biol Chem* **279**: 38062-38071.

Peshavaria, M., Henderson, E., Sharma, A., Wright, C.V., and Stein, R. (1997). Functional characterization of the transactivation properties of the PDX-1 homeodomain protein. *Mol Cell Biol* **17**: 3987-3996.

Petersen, H.V., Serup, P., Leonard, J., Michelsen, B.K., and Madsen, O.D. (1994). Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10465-10469.

Philippe, J., Chick, W.L., and Habener, J.F. (1987). Multipotential phenotypic expression of genes encoding peptide hormones in rat insulinoma cell lines. *J Clin Invest* **79**: 351-358.

Philippe, J. and Missotten, M. (1990). Functional characterization of a cAMP-responsive element of the rat insulin I gene. *J Biol Chem* **265**: 1465-1469.

Phippard, D., Lu, L., Lee, D., Saunders, J.C., and Crenshaw, E.B., 3rd. (1999). Targeted mutagenesis of the POU-domain gene Brn4/Pou3f4 causes developmental defects in the inner ear. *J Neurosci* **19**: 5980-5989.

Pontoglio, M., Barra, J., Hadchouel, M., Doyen, A., Kress, C., Bach, J.P., Babinet, C., and Yaniv, M. (1996). Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* **84**: 575-585.

Pontoglio, M., Sreenan, S., Roe, M., Pugh, W., Ostrega, D., Doyen, A., Pick, A.J., Baldwin, A., Velho, G., Froguel, P., Levisetti, M., Bonner-Weir, S., Bell, G.I., Yaniv, M., and Polonsky, K.S. (1998). Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. *J Clin Invest* **101**: 2215-2222.

Qiu, Y., Guo, M., Huang, S., and Stein, R. (2002). Insulin gene transcription is mediated by interactions between the p300 coactivator and PDX-1, BETA2, and E47. *Mol Cell Biol* **22**: 412-420.

Qiu, Y., Sharma, A., and Stein, R. (1998). p300 mediates transcriptional stimulation by the basic helix-loop-helix activators of the insulin gene. *Mol Cell Biol* **18**: 2957-2964.

Qu, S., Niswender, K.D., Ji, Q., van der Meer, R., Keeney, D., Magnuson, M.A., and Wisdom, R. (1997). Polydactyly and ectopic ZPA formation in Alx-4 mutant mice. *Development* **124**: 3999-4008.

Qu, S., Tucker, S.C., Zhao, Q., deCrombrugghe, B., and Wisdom, R. (1999). Physical and genetic interactions between Alx4 and Cart1. *Development* **126**: 359-369.

Ramirez, S., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. (1997). The CREB-binding protein (CBP) cooperates with the serum response factor for transactivation of the c-fos serum response element. *J Biol Chem* **272**: 31016-31021.

Read, M.L., Clark, A.R., and Docherty, K. (1993). The helix-loop-helix transcription factor USF (upstream stimulating factor) binds to a regulatory sequence of the human insulin gene enhancer. *Biochem J* **295**: 233-237.

Robertson, J.D., Gogvadze, V., Kropotov, A., Vakifahmetoglu, H., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2004). Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *EMBO Rep* **5**: 643-648.

Rossi, J.M., Dunn, N.R., Hogan, B.L., and Zaret, K.S. (2001). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* **15**: 1998-2009.

Rudnick, A., Ling, T.Y., Odagiri, H., Rutter, W.J., and German, M.S. (1994). Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12203-12207.

Rychlik, J.L., Hsieh, M., Eiden, L.E., and Lewis, E.J. (2005). Phox2 and dHAND transcription factors select shared and unique target genes in the noradrenergic cell type. *J Mol Neurosci* **27**: 281-292.

Sander, M. and German, M.S. (1997). The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J Mol Med* **75**: 327-340.

Sander, M., Neubuser, A., Kalamaras, J., Ee, H.C., Martin, G.R., and German, M.S. (1997). Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* **11**: 1662-1673.

Sander, M., Sussel, L., Connors, J., Scheel, D., Kalamaras, J., Dela Cruz, F., Schwitzgebel, V., Hayes-Jordan, A., and German, M. (2000). Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* **127**: 5533-5540.

Schrauwen, P. and Hesselink, M.K. (2004). Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes* **53**: 1412-1417.

Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., and Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* **17**: 6419.

Schulla, V., Renstrom, E., Feil, R., Feil, S., Franklin, I., Gjinovci, A., Jing, X.J., Laux, D., Lundquist, I., Magnuson, M.A., Obermuller, S., Olofsson, C.S., Salehi, A., Wendt, A., Klugbauer, N., Wollheim, C.B., Rorsman, P., and Hofmann, F. (2003). Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)1.2 Ca²⁺ channel null mice. *Embo J* **22**: 3844-3854.

Schwartz, P.T. and Vallejo, M. (1998). Differential regulation of basal and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-induced somatostatin gene transcription in neural cells by DNA control elements that bind homeodomain proteins. *Mol Endocrinol* **12**: 1280-1293.

Schwitzgebel, V.M., Scheel, D.W., Connors, J.R., Kalamaras, J., Lee, J.E., Anderson, D.J., Sussel, L., Johnson, J.D., and German, M.S. (2000). Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* **127**: 3533-3542.

Seed, B. and Sheen, J.Y. (1988). A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. *Gene* **67**: 271-277.

Serup, P., Petersen, H.V., Pedersen, E.E., Edlund, H., Leonard, J., Petersen, J.S., Larsson, L.I., and Madsen, O.D. (1995). The homeodomain protein IPF-1/STF-1 is expressed in a subset of islet cells and promotes rat insulin 1 gene expression dependent on an intact E1 helix-loop-helix factor binding site. *Biochem J* **310**: 997-1003.

Sharma, A., Moore, M., Marcora, E., Lee, J.E., Qiu, Y., Samaras, S., and Stein, R. (1999). The NeuroD1/BETA2 sequences essential for insulin gene transcription colocalize with those necessary for neurogenesis and p300/CREB binding protein binding. *Mol Cell Biol* **19**: 704-713.

Shieh, S.Y. and Tsai, M.J. (1991). Cell-specific and ubiquitous factors are responsible for the enhancer activity of the rat insulin II gene. *J Biol Chem* **266**(25): 16708-16714.

Sladek, F.M. 1994. Orphan receptor HNF-4 and liver-specific gene expression. *Receptor* **4**: 64.

Soria, B., Skoudy, A., and Martin, F. (2001). From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* **44**: 407-415.

St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A., and Gruss, P. (1997). Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* **387**: 406-409.

Stanojevic, V., Habener, J.F., and Thomas, M.K. (2004). Pancreas duodenum homeobox-1 transcriptional activation requires interactions with p300. *Endocrinology* **145**: 2918-2928.

Stanojevic, V., Yao, K.M., and Thomas, M.K. (2005). The coactivator Bridge-1 increases transcriptional activation by pancreas duodenum homeobox-1 (PDX-1). *Mol Cell Endocrinol* **237**: 67-74.

Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**: 307-312.

Stoffers, D.A., Ferrer, J., Clarke, W.L., and Habener, J.F. (1997a). Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* **17**: 138-139.

Stoffers, D.A., Zinkin, N.T., Stanojevic, V., Clarke, W.L., and Habener, J.F. (1997b). Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* **15**: 106-110.

Sussel, L., Kalamaras, J., Hartigan-O'Connor, D.J., Meneses, J.J., Pedersen, R.A., Rubenstein, J.L., and German, M.S. (1998). Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* **125**: 2213-2221.

Thomas, M.K., Yao, K.M., Tenser, M.S., Wong, G.G., and Habener, J.F. (1999). Bridge-1, a novel PDZ-domain coactivator of E2A-mediated regulation of insulin gene transcription. *Mol Cell Biol* **19**: 8492-8504.

Thuerauf, D.J., Arnold, N.D., Zechner, D., Hanford, D.S., DeMartin, K.M., McDonough, P.M., Prywes, R., and Glembofski, C.C. (1998). p38 Mitogen-activated protein kinase mediates the transcriptional induction of the atrial natriuretic factor gene through a serum response element. A potential role for the transcription factor ATF6. *J Biol Chem* **273**: 20636-20643.

Tucker, S.C. and Wisdom, R. (1999). Site-specific heterodimerization by paired class homeodomain proteins mediates selective transcriptional responses. *J Biol Chem* **274**: 32325-32332.

Ubeda, M., Vallejo, M., and Habener, J.F. (1999). CHOP enhancement of gene transcription by interactions with Jun/Fos AP-1 complex proteins. *Mol Cell Biol* **19**: 7589-7599.

Vaxillaire, M. and Froguel, P. (2006). Genetic basis of maturity-onset diabetes of the young. *Endocrinol Metab Clin North Am* **35**: 371-384.

Vierra, C.A. and Nelson, C. (1995). The Pan basic helix-loop-helix proteins are required for insulin gene expression. *Mol Endocrinol* **9**: 64-71.

Volinic, J.L., Lee, J.H., Eto, K., Kaur, V., and Thomas, M.K. (2006). Overexpression of the coactivator bridge-1 results in insulin deficiency and diabetes. *Mol Endocrinol* **20**: 167-182.

Wang, H., Maechler, P., Antinozzi, P.A., Hagenfeldt, K.A., and Wollheim, C.B. (2000). Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem* **275**: 35953-35959.

Wang, L., Coffinier, C., Thomas, M.K., Gresh, L., Eddu, G., Manor, T., Levitsky, L.L., Yaniv, M., and Rhoads, D.B. (2004). Selective deletion of the Hnf1beta (MODY5) gene in beta-cells leads to altered gene expression and defective insulin release. *Endocrinology* **145**: 3941-3949.

Watada, H., Scheel, D.W., Leung, J., and German, M.S. (2003). Distinct gene expression programs function in progenitor and mature islet cells. *J Biol Chem* **278**: 17130-17140.

Weaver, M., Yingling, J.M., Dunn, N.R., Bellusci, S., and Hogan, B.L. (1999). Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. *Development* **126**: 4005-4015.

Wilson, D., Sheng, G., Lecuit, T., Dostatni, N., and Desplan, C. (1993). Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes Dev* **7**: 2120-2134.

Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P.J., Menzel, S., Cox, N.J., Fajans, S.S., Signorini, S., Stoffel, M., and Bell, G.I. (1996a). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* **384**: 458-460.

Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P.J., Menzel, S., Furuta, H., Vaxillaire, M., Southam, L., Cox, R.D., Lathrop, G.M., Boriraj, V.V., Chen, X., Cox, N.J., Oda, Y., Yano, H., Le Beau, M.M., Yamada, S., Nishigori, H., Takeda, J., Fajans, S.S., Hattersley, A.T., Iwasaki, N., Hansen, T., Pedersen, O., Polonsky, K.S., Bell, G.I., and et al., (1996b). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* **384**: 455-458.

Zhang, C., Moriguchi, T., Kajihara, M., Esaki, R., Harada, A., Shimohata, H., Oishi, H., Hamada, M., Morito, N., Hasegawa, K., Kudo, T., Engel, J.D., Yamamoto, M., and Takahashi, S. (2005). MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* **25**: 4969-4976.